

Vol. 31, No. 3.

May, 1940

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; NOBORU ARIYAMA, Niigata; AKIJI FUJITA, Tokyo; KIKO GOTO, Kyoto; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIDZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; HAZIME MASAMUNE, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; SHIGEO SUZUKI, Kagoshima; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUUI SUYEYOSHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Taihoku; SENJI UCHINO, Sendai; TOYOO UCHINO, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$6.00 per volume.



BIOCHEMICAL STUDIES ON CARBOHYDRATES.

LVIII. Prosthetic Group of Tendomucoid. First Paper.

By

MASAMI SUZUKI.

(From the Medico-Chemical Institute, Hokkaido Imperial University,
Sapporo. Director: Prof. H. Masamune.)

(Received for publication, March 29, 1940)

No small amount of effort was expended on the chemistry of tendon mucoid by Loebisch (1886), Chittenden and Gies (1896), Cutter and Gies (1901-02), Levene (1901, 1903), and Levene and La Forge (1914), and the problem as to the nature of its prosthetic group appears to have been settled by the work of the last authors who identified it with chondroitinsulfuric acid. Dr. Hisamura, however, recently discovered in our Institute that chondro- as well as osseo-mucoid involves a notable amount of a polysaccharide composed of galactose and acetylhondrosamine in addition to chondroitinsulfuric acid. The present research deals with the question if the same holds in tendomucoid.

EXPERIMENTS AND DISCUSSION.

Preparation of Tendomucoid.

It was prepared from the tendon of oxen (tendon of the flexor digiti pedis profundus) according to the "general method" of Cutter and Gies, as follows:

The shaft of the tendon was freed from extraneous matter and sheath. Each weighed about 60 gm.

Prep. I and II: 5 tendons (300 gm.) were minced and washed with several changes of distilled water over night. Then the moist pulp was shaken for two days with 1200 cc. of half-saturated $\text{Ca}(\text{OH})_2$ solution, after the addition of a little alcoholic thymol

solution. Extraction was repeated twice more and the extracts were combined, strained first through cloth, then through a filter paper. The filtrate amounted to 1500 cc. The mucoid was precipitated by the addition of 40 cc. of 0.2% hydrochloric acid. pH was lowered to 3.0. It was treated many times with 0.2% hydrochloric acid, until no biuret-giving substance came over to the washing, and then several times with water. The product was purified by redissolution in 500 cc. of half-saturated $\text{Ca}(\text{OH})_2$ solution, filtered through a filter paper and reprecipitated by means of a few drops of 10% hydrochloric acid under shaking, followed by the process of washing. The substance was finally boiled for two days with large quantities of an alcohol-ether mixture (1:1). Yield, 1.2 gm. (Prep. I) and 1.1 gm. (Prep. II).

Prep. III: It was prepared similarly, but the first extract alone was taken. Yield, 0.8 gm.

Assays of the Mucoid.

1) Qualitative.

The preparations were almost free from phosphorus. They responded to biuret (violet), xanthoprotein, Millon, Sakaguchi (deep red), and diazo (orange red) reactions for protein but not to the Hopkins-Cole or Morse reaction. The Molisch test gave a red colour with a green tint. Subsidence occurred by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (at half saturation), phosphotungstic acid (with sulfuric acid) and trichloroacetic acid appreciably, but only turbidity was caused by mercuric acetate, mercuric chloride and tannic acid. Ferricyanide (with acetic acid) was not effective. Heat coagulation did not take place.

The Blix test for aminosugar gave a red colour, though only faintly, immediately without antecedent heating with alkali. Naphthoresorcinol and aniline acetate tests for uronic acid were positive.

2. Quantitative.

The preparations were submitted to the procedures of quantita-

tive analysis, which have been employed in this laboratory for the investigations of this series. Table I summarizes the results.

TABLE I.

Analyses	In per cent			Expressed as equivalents per equivalent weight		
	Prep. I	Prep. II	Prep. III	Prep. I	Prep. II	Prep. III
Nitrogen	12.51	12.44	12.42			
Reducing force, after hydrolysis ¹⁾ as glucose						
i) Total reduction	33.63	29.67	31.42			
ii) Carbohydrate reduction	23.06	22.95	23.47			
Aminosugar as chondrosamine	14.53	14.03	14.53	2.00	2.00	2.00
Acetyl	3.55	3.35	3.57	2.04	1.99	2.04
Glucuronic acid calc. from furfural yield	7.80	7.25	7.60	0.99	0.95	0.97
Acid hydrolyzable sulfur	1.78	1.61	1.72	1.37	1.28	1.33
Galactose ²⁾						
i) By indole method	7.00	6.97	7.03			
ii) By orcinol method	6.84	6.97	6.85			
iii) By diphenylamine I method	6.84	6.80	6.91			
iv) By reduction method	6.91	6.86				
mean :	6.90	6.90	6.93	0.94	0.98	0.95
Ash	0.78	1.07	0.80			

1) Hydrolysis: 4 hours.

2) Identified by the second procedure of the Masamune-Tanabe method, as the colorimetric figures and reducing forces indicate.

The amounts of glucuronic acid are perhaps a little more than the values computed out from furfural yields, because chondroitin-sulfuric acid gives less furfural than ordinary conjugated glucuronic acid (ref. Tanabe). At any rate, however, the equivalent proportion of glucuronic acid and galactose, which has been identified by analysis, lies around 1 to 1. This suggests in turn that chondroitinsulfuric acid and acetylchondrosamine-galactose complex occur in nearly equimolecular ratio as was found

by Hisamura in ox chondromucoid. Analysis gave somewhat higher values of acid-hydrolyzable sulphur than correspond to chondroitinsulfuric acid, as calculated from the quantitative relation of galactose and hexosamine. This is seemingly due to inorganic impurities.

*Separation from each other of the assumed
polysaccharides.*

It was carried out by alkaline scission as was done by Hisamura. 15 gm. of tendomucoid, newly prepared, were taken for this purpose.

Fraction a (fraction of chondroitinsulfuric acid): Yield, 550 mg. Biuret reaction was not given. The Molisch test developed a green colour with a red tint.

TABLE II.

Analyses	In per cent		Equivalents per equivalent weight	
	Fraction a	Fraction b	Fraction a	Fraction b
Nitrogen	2.70	13.74	1.20	
Reducing force, after hydrolysis, as glucose				
i) Total reduction	44.53	13.15		
ii) Carbohydrate reduction.	42.01	8.68		
Aminosugar as chondrosamine	28.86	4.30	1.00	1.00
Acetyl	7.15	1.19	1.03	1.15
Glucuronic acid				
i) By furfural method	30.06		0.96	
ii) By indole method	33.93		1.09	
iii) By orcinol method	33.48		1.07	
Sulfate-sulfur	5.70	0.56	1.10	
Galactose				
i) By indole method		4.34		1.00
ii) By orcinol method		4.31		1.00
iii) By diphenylamine I method		4.18		0.96
Ash	25.59	3.44		

Fraction b (fraction containing the acetylchondrosamine-galactose complex): Yield, 370 mg. Biuret reaction was positive. The Molisch test developed a red colour. Naphthoresorcinol test (Neuberg-Saneyoshi) was negative.

The analytical data of these fractions are listed in Table II.

The fraction of chondroitinsulfuric acid was still contaminated with nitrogenous compounds and the ash of Fraction b is thought to contain sulfate. The acetyl value of the latter fraction amounted to somewhat more than the calculation from the chondrosamine content, but it is evidently to be ascribed to the rest of this product (ref. Suzuki 1938). A more detailed explanation of the figures would be superfluous.

Identification of the sugar-constituents by isolation is now being undertaken.

SUMMARY.

It was disclosed that an itinsulfuric acid, probably chondroitinsulfuric acid, and an acetylhexosamine-galactose complex are involved in ox tendomucoid in an approximately equimolecular proportion.

The Foundation for the Promotion of Science and Industrial Research of Japan gave a grant for the costs of this research. The writer appreciates it gratefully.

REFERENCES.

- Chittenden, R. H. and Gies, W. J. (1896): *J. Exp. Med.*, **1**, 186.
 Cutter, W. D. and Gies, W. J. (1901-02): *Am. J. Physiol.*, **6**, 155.
 Hisamura, H. (1938): *J. Biochem.*, **28**, 217.
 Levene, P. A. (1901): *Zeits. Physiol. Chem.*, **31**, 395.
 Levene, P. A. (1903): *Zeits. Physiol. Chem.*, **39**, 1.
 Levene, P. A. and La Forge, F. B. (1914): *J. Biol. Chem.*, **18**, 237.
 Loebisch, W. F. (1886): *Zeits. Physiol. Chem.*, **10**, 40.
 Suzuki, M. (1938): *J. Biochem.*, **27**, 367.



Digitized by the Internet Archive
in 2024

ÜBER DIE OXYDATION IM ORGANISMUS.*

I. Mitteilung.

Oxydation von α -Picolin in den verschiedenen Organen.

VON

MASANARI NAGAOKA.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. N. Kageura,
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 30. März 1940)

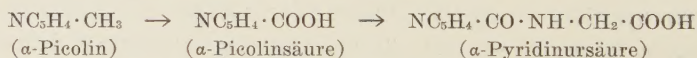
Die Vorgänge der Oxydoreduktion im Organismus vollziehen sich ununterbrochen, um die zur Erhaltung des Lebens notwendige Energie aus organischen Verbindungen, wie Fett, Kohlehydrat und Eiweiss zu erzeugen. Das betreffende Gebiet ist schon von verschiedenen Seiten sehr eingehend studiert worden. Ausführliche Beschreibungen darüber sind aber neuerdings von Holmes (1937) und Uchino (1938) veröffentlicht worden. Nach Uchino beruht die Oxydoreduktion wesentlich auf der in komplizierter Weise stattfindenden Transportierung des Wasserstoffes, um letzten Endes Wasser und Kohlensäure zu erzeugen; die Transportierung des Wasserstoffes geschieht durch Vermittlung von Redoxkatalysatoren in verschiedenen Oxyreduktionssystemen; die Enzyme, Vitamine und Hormone haben im Lebensprozess deshalb eine grosse Bedeutung, weil sie Redoxkatalysatoren oder deren Muttersubstanz darstellen und miteinander in enger Beziehung stehen, was aus ihren chemischen Strukturen leicht verständlich ist.

Im Tierkörper spielen ringförmige Körper biochemisch eine besondere Rolle; sie werden nämlich teils als oxydierte Substanzen, teils als Verbindung mit Zwischenprodukten des normalen intermediären Stoffwechsels im Urin ausgeschieden. Andererseits verhalten sich die Benzolderivate und die Pyridingruppe in ihren

* Die vorliegende Arbeit wurde bereits teilweise auf der 4. Tagung der Japanischen Gesellschaft für Ernährungswissenschaft in Tokyo am 1. April 1937 öffentlich vorgetragen.

biochemischen Eigenschaften sehr ähnlich. His (1887) stellte als Erster fest, dass beim Hunde das verabreichte Pyridin als Methylpyridylammoniumhydroxyd im Harn ausgeschieden wird, was von Cohn (1893) bestätigt wurde. Nach Tomita (1921) findet diese Methylierung hauptsächlich in der Leber statt. Cohn teilte mit, dass bei Säugetieren das verabfolgte Furfurol zu Brenzschleimsäure oxydiert wird, welche durch Verbindung mit Glykokoll Pyromycur-säure bildet; andererseits entsteht aus ihm durch Oxydation als Nebenprodukt Furfuracrylsäure, welche durch Verbindung mit Glykokoll als Furfuracrylsäure im Harn gefunden wird; bei Vögeln verbindet sich dasselbe mit Ornithin, um als Furfuror-nithursäure ebenfalls im Harn nachgewiesen zu werden. Wöhler und Frerichs (1848) wiesen die Tatsache auf, dass das Benzaldehyd in dem lebenden Organismus zu Benzoessäure oxydiert, welche sich mit Glykokoll verbindet, um als Hippursäure im Harn ausgeschieden zu werden.

Cohn (1893) gab den Hunden und Kaninchen eine gewisse Menge α -Picolin ein und konnte eine Verbindung von α -Picolinsäure, einem Oxydationsprodukt des Picolins, und Glykokoll im Harn nachweisen. Er nannte diese neu gefundene Verbindung α -Pyridinursäure, welche mittels Barytwasser zu α -Picolinsäure und Glykokoll gespalten werden konnte. Im Harn des Hundes, Kaninchens und Frosches, denen vorher Picolinsäure gegeben worden war, fand Sendju (1926) α -Pyridinursäure. Die dabei gebrauchte Picolinsäure wurde durch Oxydation des Picolins mit Kaliumpermanganat gewonnen. Nach Cohn und Sendju können also die chemischen Voränge des Picolins in dem lebenden Organismus mit des folgenden Formel gezeigt werden:



Sendju konnte bei Vögeln eine Verbindung von Picolinsäure und Ornithin aus dem Harn extrahieren und nannte sie α -Pyridinornithursäure; $(\text{NC}_5\text{H}_4\cdot\text{CO})\cdot\text{HN}\cdot\text{CH}_2\cdot(\text{CH}_2)_2\cdot\text{CH}\cdot\text{NH}\cdot(\text{NC}_5\text{H}_4\text{CO})\cdot\text{COOH}$. Durch Kochen mit Barytwasser wird diese Substanz in Ornithin und α -Picolinsäure gespalten.

α -Picolin d.h. α -Methylpyridin $\text{NC}_5\text{H}_4\cdot\text{CH}_3$ ist eine farblose

Flüssigkeit mit penetrantem Geruch, die aus Tieröl (Anderson 1864) und auch aus Steinkohlenteer (Goldschmidt 1883) gewonnen wird. Spezifisches Gewicht 0,949 (15°C), Siedepunkt 129°–130°C. Da das Picolin ein Pyridinderivat ist, zeigt es auch pharmakologisch ähnliche Wirkungen wie Pyridin und dessen Derivate. Nach den Untersuchungen von Lewin (1929) stellte man fest, dass Picolin durch subkutane Injektion eine Entzündung hervorruft und die Schleimhaut verätzt; wenn man Tauben Picolindämpfe einatmen lässt, werden dieselben in der Atmungstätigkeit gelähmt; für Fröche ist die subkutane Injektion von zwei Tropfen Picolin schon genug, um nach 10 oder 20 Minuten Bewegungslähmung und Bewusstseinsstörung hervorzurufen; für dieselben beträgt die letale Dosis 0,15 g; Kaninchen werden 2 Stunden nach der ebenfalls subkutanen Einspritzung in der Atmungstätigkeit gelähmt und von Krämpfen befallen. Nach Untersuchungen von Cohn trat Eiweiss im Harn auf bei 3 Kaninchen, denen man eine Woche lang täglich 0,5–1,0 g Picolin eingab; ausserdem fand man hyaline Zylinder in kleiner Menge und granulierte Zylinder in grosser Menge sowie auch Epithelzellen; das eine von den 3 Kaninchen starb an Krämpfen, ein anderes litt an denselben Krämpfen wiederholt, das letzte allein blieb gesund. Als derselbe Autor Hunden das Picolin subkutan, am ersten Tage 2,4 g; am zweiten Tage 3,6 g in einmaliger Dosis gab, bekamen die Tiere nach der zweiten Injektion Erbrechen; es bildeten sich nach einigen Tagen an den Injektionsstellen grosse Abszesse.

Herbert (1934) hat unter Fabrikarbeitern, die über einen längeren Zeitraum fortgesetzt Rohpyridin (welches ausser Picolin noch kleine Mengen von Litidinen und Collidinen enthält) einatmeten, 2 Fälle von Vergiftungserscheinungen erkannt, die hauptsächlich die folgenden Symptome zeigten; Pseudoencephalitis mit Augenmuskellähmung, Cerebellarataxie, Vagussehädigung, Facialisparese, Anisokorie, ataktischer Gang und dergleichen.

α -Picolinsäure d.h. Pyridin- α -Carbonsäure $\text{NC}_5\text{H}_4\cdot\text{COOH}$ kristallisiert nadelförmig, ist ohne Geruch und leicht sublimierbar und wird durch Oxydation mittels übermangansaurem Kalium gewonnen. Ihr Schmelzpunkt liegt bei 134°C–136°C. In Wasser

und Alkohol ist sie leicht löslich, aber in Äther kaum (Schmidt und Jacobsen). Nach Takase (1937) hat die Picolinsäure auf Kaninchen eine sedative bzw. lähmende Wirkung; bei Kaltblutern ruft dieselbe vor allem Symptome von Lähmung hervor.

Karaschima (1927) stellte fest, dass das Oxymethylfurfural im Tierkörper zu Oxymethylbrenzschleimsäure oxydiert wird und durch den Harn zur Ausscheidung gelangt. Durch Durchspülung verschiedener Organe haben Sendju und Matuoka (1936) gefunden, dass die Oxydation des Oxymethylfurfurals zum grosseren Teil in der Leber, zum kleineren auch an der Magenwand stattfindet, aber durchaus nicht in der Milz, in den Lungen und Nieren. Bei solchen Sachlage hat Verfasser die vorliegende Untersuchung angestellt, um die Frage zu beantworten, in welchem Organ und in welcher Masse der Oxydationsvorgang im Organismus von statten geht.

I. VERSUCHSANORDNUNG.

Als Versuchstiere sind ausgewachsene männliche Hunde von 10–15 kg Körpergewicht angewandt worden, um Alters- und Geschlechtsunterschiede im Oxydationsvorgang zu vermeiden, weil nach Iwamoto (1935) die Oxydationsprozesse je nach dem Geschlecht nicht immer dieselben sind. Die verschiedenen Organe, wie Leber, Magen, Darm, Milz, Lungen und Nieren wurden mit dem Blut desselben Tieres, dem 1,5 g α -Picolin (Kahlbaum) zugesetzt wurde, mittels des Yamakawa-Mizukischen Apparates 1,5–2 St. lang durchblutet. Nach Abschluss des Verfahrens wurde das gesammelte Blut zur chemischen Analyse verwendet. Dabei wurde jede Bedingung des natürlichen Lebensprozesses so genau wie möglich nachgeahmt. Das durchströmte Blut, welches praktisch ohne Verlust gesammelt worden war, wurde mit Senckescher Lösung vollständig enteiweiss. Aus dem Filtrat wurde das Quecksilber durch Einleitung von Schwefelwasserstoff entfernt. Das gewonnene Filtrat wurde mit Natron schwach sauer gemacht, durch Vakuumdestillation bis zu einer zweckentsprechenden Menge konzentriert, dann mittels Natronlösung neutralisiert. Das Filtrat wurde mit Schwefelsäure versetzt und ferner eine wässrige Lösung

von Phosphorwolframsäure (Merk) hinzugefügt. Nach 24-stündigen Stehenlassen wurde das Gemisch filtriert. Der Rückstand wurde mit Baryt versetzt, um die Schwefelsäure und Phosphorwolframsäure zu entfernen. Hierauf wurde das Filtrat durch Einleitung von Kohlensäuregas vom Barium befreit und noch einmal filtriert. Man konzentrierte das Filtrat durch Vakuumdestillation, filtrierte und behandelte mit absolutem Alkohol. Der alkoholische Extrakt wurde im Vakuum abgedampft und der Rückstand in kleiner Menge Wasser gelöst und liegen gelassen. Durch dieses Verfahren kann man eine weisse, schöne, in Nadelform krystallisierte Masse gewinnen.

II. ERGEBNISSE DES VERSUCHES.

Die ganzen Ergebnisse wurden übersichtlichkeitshalber in

Nr. der Hunde	Organ	Menge des durch Schlingung blutes cem	Belastung mit 2% des spez. Gew. g	Durch- stromungs- dauer Std.	Gewinn- stromungs- säure g
1	Harn	400	1,5	1,5	0,5148
2		400	1,5	1,5	
3		400	1,5	1,5	
4		400	1,5	1,5	
5		400	1,5	1,5	
6	Magen	300	1,5	1,5	(—)
7		300	1,5	1,5	
8		300	1,5	1,5	
9		400	1,5	1,5	
10		500	1,5	1,5	
11	Lungen	400	1,5	1,5	(—)
12		400	1,5	1,5	
13		400	1,5	1,5	
14		300	1,5	1,5	
15		400	1,5	1,5	
16	Niere	300	1,5	2	0,1022
17		400	1,5	2	
18		300	1,5	2	
19		300	1,5	2	
20		300	1,5	2	
21	Darm	400	1,5	1,5	(—)
22		400	1,5	1,5	
23		400	1,5	1,5	
24	Mus.	400	1,5	1,5	(—)

einer Tabelle zusammengestellt.

Die Krystalle schmelzen unter Gasentwicklung bei 133–136°. Durch folgende Analyse ist also sicher festgestellt, dass es sich um die α -Picolinsäure handelt.

0,0383 g Substanz gaben 0,0815 g CO₂, 0,0150 g H₂O.

0,0340 g Substanz gaben 3,3 ccm N (9,5°, 760 mm).

Berechnet für C₆H₅NO₂:

Gefunden:

C	58,53%	58,00%
H	4,94%	4,38%
N	11,40%	11,59%

III. SCHLUSSBETRACHTUNG.

Wie oben angegeben, ist die gewonnene Ausbeute durch Elementaranalyse als α -Picolinsäure festgestellt worden. Aber die Menge ist so klein, dass sie für die fünf Organe bei der Leber 0,2148 g und bei der Niere 0,1022 g beträgt, d. h. 3,2% bzw. 1,5% des gebrauchten gesamten Picolins (7,5 g). Nach Cohn (1893) soll der Harn der Kaninchen, der nach Picolininjektion am Ende der 1. oder 2. Stunde ausgeschieden wurde, einen sehr scharfen, dem Picolin eigentümlichen Geruch haben. Bei dem vorliegenden Versuch konnte Verf. am durchströmten Blut dieselbe Tatsache beobachten. Es liegt nahe, daraus zu schliessen, dass im durchströmten Blut eine gewisse Menge von nichtoxydiertem Picolin enthalten ist.

Durch Durchströmung der Kaninchenleber mit Belastung von Natriumbenzoat, aber ohne Belastung von Glykokoll beobachteten Friedmann und Tachu (1911) die Tatsache, dass die Hippursäure, eine Verbindung der Benzoessäure mit dem Glykokoll, in der Leber synthetisiert wird. Wie oben dargestellt, besteht das Schicksal des Picolins im lebenden Organismus darin, dass es zunächst zu Picolinsäure oxydiert wird, welche sich mit dem Glykokoll verbindet, um α -Pyridinursäure zu bilden. Daraus erhebt sich nun die Frage, ob die zwei Prozesse, nämlich die Oxydation und die Paarung, beim Durchblutungsverfahren gleichzeitig stattfinden. Es wäre interessant zu erfahren, ob man durch Durchblutung nach Belastung von Picolinsäure die Bildung von

Pyridinursäure beobachten kann. Wie erwähnt, haben Sendju und Matuoka (1936) gefunden, dass die Oxydation des Oxymethylfurfurols hauptsächlich in der Leber, aber auch teilweise in der Magenwand zu beobachtet ist. Bei meinen Versuchsergebnissen stellte sich heraus, dass die Oxydationsvorgänge des α -Picolins sowohl in der Leber, als auch in der Niere stattfinden und zwar in der ersteren erheblicher als in der letzteren. Die geringfügige Inkongruenz der Oxydationsstätte des Oxymethylfurfurols und des Picolins ist merkwürdig. Schliesslich kann man die gefundenen Tatsachen wie folgt zusammenfassen.

1. Die Oxydationsvorgänge des α -Picolins gehen in der Leber und den Nieren vor sich und zwar in der Leber stärker als in den Nieren.

2. Die Oxydation ist in Lungen, Magen, Milz und Darm gar nicht nachweisbar.

Zum Schluss ist es mir eine angenehme Pflicht, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. N. Kageura für seine Leitung und Förderung bei dieser Untersuchung und Herrn Prof. Dr. Y. Sendju sowie Dr. S. Sumida für ihre freundliche Unterstützung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

Anderson u. Goldschmidt (1922): Beilsteins Handb. d. organ. Chem., 4. Aufl., **20**, 234.

Cohn, R. (1893): Hoppe-seyl. Z. f. physiol. Chem., **18**, 112.

Friedmann u. Tachu (1911): Biochem. Z., **35**, 88.

Herbert, L. (1935): Ber. über d. gesam. physiol. u. exper. Pharm., **87**, 448.

His, W. (1887): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **22**, 253.

Holmes, E. (1937): The metabolism of Living tissues. Cambridge, at the university press.

Iwamoto, S. (1935): Nagasaki Igakkaizasshi, **13**, 281.

Jacobson, P. (1920): Lehrb. d. Organ. Chem. 1. u. 2. Aufl., Berlin, **2**, 869.

Karashima, S. (1927): Hoppe-Seyl. Z. f. physiol. Chem., **169**, 278.

Lewin, L. (1929): Lehrb. d. Toxikol. 4. Aufl., Berlin, 583.

Schmidt, J. (1922): Kurzes Lehrb. d. Organ. Chem., 3. Aufl. Stuttgart, **675**.

Sendju, Y. (1926): J. of Biochem., **7**, 273.

- Sendju, Y. u. Matsuoka, Y. (1936): Nagasaki Igakkaizassi, **14**, 1678.
Sendju, Y. (1937): J. of Biochem., **25**, 490.
Takase, T. (1937): Kagakukozo to Seirisayoo, verbesserte Aufl. Kyoto, 865.
Tomita, M. (1921): Biochem. Zeitschr., **116**, 58.
Uchino, U. (1938): Nippon Izisinpoo, **822**, 3.
Wöhler, F. u. Frerichs, F. (1848): Liebig's Annal. d. Chem., **65**, 335.
Yamakawa u. Mizuki (1917): Tokyo Igakkaizassi, **32**, 862.

A COMPARISON OF ALKALINE ALCOHOLIC AND ACID ACETONE EXTRACTION METHODS OF PREPARING LACTOGENIC HORMONE OF THE ANTERIOR PITUITARY.

By

NAO UYEI, MASAO ITOH, MASAYOSHI KATO AND
TOHRU TAKAHASHI.

(Teikokusha Hormone Research Institute, Kawasaki-shi.)

(Received for publication, April 6, 1940)

The presence of a lactogenic principle in the pituitary was first suggested by Ott and Scott in 1910, who obtained an increased milk secretion from a lactating goat by the injection of the posterior lobe extract. Later experiments by other investigators, however, showed that the anterior lobes, instead of the posterior contained the lactogenic principle. Stricker and Grueter (1928), for example, were able to cause lactation in spayed rabbits or other animals by the injection of anterior lobe extract. Riddle, Turner, Lyons, Nelson and others have contributed in one way or another to the study of this hormone. Gardner and Turner (1933) called this principle "galactin," Riddle and his associates (1933) termed theirs "prolactin," while Lyons (1937) called his preparation "mammotropin."

We are interested in finding the best method of preparing a lactogenic hormone which can be used for clinical purposes. Previously, Bergman and Turner (1937) have reported that a comparative study of various methods of preparing lactogenic hormone showed that Bates and Riddle's (1935) method of alkaline alcohol extraction gave the best results. This statement, however, does not imply that the method gives a purer form of the hormone than the other method, since they did not give any other data than the table to show the yields of the hormone in McShan and Turner units. Recently, White, Catchpole and Long (1937) claimed to have obtained crystalline lactogenic

hormone by the acid acetone method of extraction and subsequent crystallization from pyridine. Rabald and Voss (1939) claimed to have extracted lactogenic hormone from the liver, but we were unable to confirm their statement.¹⁾

In this paper we shall describe the method of assaying the lactogenic hormone used by us and the results of a comparative study of the alkaline alcoholic and acid acetone extraction methods of preparing lactogenic hormone.

Experimental.

I. METHOD OF ASSAY.

The method used by us is a modification of the original method of Riddle, Bates and Dykeshorn (1933). In the original method a sample of prolactin is injected into the pectoral muscles of pigeons or doves, once daily for four days. On the fifth day the birds are dissected. The crop glands are examined and the potency of the samples are evaluated according to the condition of stimulation and weight increase of the crop glands. Since it is quite expensive to dissect all the pigeons or doves used in our routine assay of lactogenic hormone, we have devised a method,²⁾ whereby the birds need not be dissected and yet a fairly reliable estimate of the lactogenic hormone can be obtained. For this purpose both male and female pigeons of adolescent or adult age are used. Just before injection of the sample, the skin layer over the crop sac on one side is incised for about two centimeters and the crop sac is exposed. The crop sac is usually transparent and the presence of food material (wheat, oats, barley, etc.) within the sac is clearly discernible. If the crop sac is opaque and thickened, the pigeon is not suitable for the assay of the hormone and should be discarded. After the examination of the sac, the opening is closed by sewing with surgical thread and an appro-

1) We are indebted to Mr. Yoshinobu Nagaoka for this part of the work.

2) We are indebted to Messrs. S. Hayatsu and F. Uyeno for the suggestion of the method described here.

priate antiseptic is applied. Then the bird is ready for prolactin injection. As in the original method of Riddle, Bates and Dykeshorn, a definite quantity of the sample solution is injected once daily for four days. On the fifth day, the crop sac located on the other side of the one previously tested is exposed and examined. According to the degree of the proliferation of the sac membrane the potency of the hormone solutions is evaluated. We designate one pigeon unit reaction, when the crop sac shows a slight but definite sign of proliferation indicated by the presence of a reddish gray opaque area in the central part of the sac.

It should be borne in mind that the examination of the sac should be made as soon as it is exposed. An irritating operation such as rubbing of the exposed area with an alcohol-soaked cotton swab or cheese cloth must be avoided, since a slight irritation of the crop sac membrane results in the thickening of the membrane and may cause an erroneous assay of the potency of the hormone solution.

After the examination of the sac, the incised area is closed by sewing with a surgical thread, an antiseptic is applied and the pigeon is kept for three or four weeks in a cage until the incised area is perfectly healed and then it is ready to be used again for prolactin assay.

II. METHOD OF PREPARING EXTRACTIONS.

A. *Alkaline Alcoholic Extraction.*

In this extraction the method of Bates and Riddle (1935) was followed. The acetone soaked anterior pituitary lobes were ground with a meat chopper and extracted five times with 70% alcohol at pH 9.6. These extracts were neutralized with dilute NaOH solution to pH 5.5 and the hormone was precipitated by adding 2.5 times the volume of 95% alcohol. The precipitate was dried by washing with absolute alcohol, acetone and ether and weighed. The dried powder was dissolved in dilute sodium hydroxide solution at pH 8.5 and assayed for the lactogenic hormone content. The supernatant from the pH 5.5 precipitate

was made to pH 4.4 and the precipitate obtained at this pH was treated in the same manner as the pH 5.5 precipitate. The results of the assay on these fractions are given in Table I.

B. Acid Acetone Method of Extraction.

In this extraction, Lyons' latest method (1937) was followed. Acetone soaked anterior pituitary lobes or acetone dried pituitary powder was extracted three times with acid acetone solution. The extracts were precipitated by adding one and one-half times the volume of pure acetone. The precipitate thus obtained was dried with acetone and dissolved in dilute sodium hydroxide solution and assayed.

The residue from the acid acetone extraction still contained some lactogenic hormone and this remaining hormone was extracted by dilute NaOH solution at pH 9.0-10.0 and after the impure proteins were precipitated at pH 8.0, the hormone was precipitated at pH 5.5. The results of the assay on acetone precipitate and pH 5.5 precipitate are given in Table I. The supernatant from the pH 5.5 precipitate still contained a small amount of lactogenic hormone, which could be precipitated at pH 4.4-5.4, but the amount was negligible and the figures for this fraction were omitted from the table.

III. RESULTS AND DISCUSSION.

The following table gives the results of some of the typical experiments comparing the efficiencies of alkaline alcoholic and acid acetone methods of extracting lactogenic hormone.

Although the gland used in the experiment was acetone soaked anterior lobes or acetone dried pituitary powder, the figures in column 2 represent the amount of gland calculated in terms of dry gland, instead of the weight of acetone soaked gland actually taken for the experiment. The acetone soaked gland used by us contained on an average about 45% of dry matter. The samples marked with an asterisk were acetone dried anterior pituitary powder.

On looking over the table, it will be noted that the extraction

TABLE I.
The Yield of Lactogenic Hormone by Alkaline Alcoholic or Acid
Acetone Extraction.

Method used	Amt. of gland used in grams	Description of the fraction	Yield in grams	No. of mgms. equiv. to one unit	Total units	Yield in units per 100 gms. dry gland	Total yield in units per 100 gms. dry gland
Bates and Riddle	116	pH 5.6 ppt.	10.900	15.00	730	629	629
Bates and Riddle	225	pH 5.6 ppt. pH 4.4 ppt.	2.490 2.350	6.00 2.50	415 940	185 418	603
Bates and Riddle	225	pH 5.5 ppt. pH 4.4 ppt.	0.240 2.128	5.30 2.50	45 851	20 334	354
Bates and Riddle	225	pH 5.5 ppt. pH 4.4 ppt.	9.230 2.400	1.75 5.00	5274 480	2344 213	2575
Lyons	200	acid acetone ext.	3.534	0.60	5931	2966	2966
Lyons	19.8	acid acetone ext. pH 5.5 ppt.	0.352 1.103	0.60 1.25	587 882	2905 4455	7420
Lyons	109.0	acid acetone ext. pH 5.5 ppt.	2.091 1.634	0.41 2.50	5100 654	4679 600	5279
Lyons	250*	acid acetone ext. pH 5.5 ppt.	2.016 6.480	0.13 0.50	15,508 12,960	6203 5184	11,387
Lyons	250*	acid acetone ext. pH 5.5 ppt.	2.262 0.980	0.125 0.125	18,095 7040	7238 2816	10,054

of the hormone by the same method does not always give a constant yield. This is due mainly to two factors. First, the biological assay method is not of an exact quantitative nature. Bates

and Riddle (1935) state that even in the same species of pigeons, there is a variation in sensitivity among individual birds to the extent of one to ten, while Lyons (1937) states that there is over a 100% variation in the crop response of Silver King squabs to "mamotropin" response. The yield of the hormone obtained by us appears much greater than the yield obtained by Lyons or by Rabald and Voss, but much less than that obtained by Itoh, Hayatsu and Uyeno (1937). Another factor which makes for variation is the incompleteness of the extraction of the hormone when acetone soaked gland is used. In this country as well as in other Oriental countries, where meat is not a staple diet of the people as in other parts of the world, it is impossible to obtain fresh pituitaries in large quantities. This necessitates the preservation of pituitaries in acetone, until a large quantity is accumulated. During the preservation in acetone, however, some of the pituitary hormones, as well as tissue proteins undergo denaturation. One of such hormones is the anterior pituitary growth hormone. It is impossible to obtain a potent growth hormone preparation from acetone soaked raw material. Fortunately, however, the lactogenic hormone is not so labile as the growth hormone and it can be recovered from the acetone soaked material. The efficiency of extraction, however, depends greatly upon the size of the granules of the raw material. The samples used in the experiment, except those in the last two, were all coarsely-ground acetone-soaked anterior lobes, which is partly responsible for the variation in the results. By using finely ground acetone dried anterior pituitary powder a much more efficient extraction could be obtained as noted by the increase in the unitage of the hormone, the results of which are given in the last two experiments by Lyons' method.

In comparing the yield of lactogenic hormone by alkaline alcoholic extraction and by acid acetone extraction methods, it seems that the latter method gives a better yield of the hormone. The average yield of four experiments was 1036 pigeons units per 100 grams of the dry gland for the alkaline alcoholic extraction, whereas, the average yield of three experiments using acetone soaked anterior pituitary was 5222 units per 100 grams of dry

gland for the acid acetone method of extraction. If we take the average of the yield of acid acetone extraction using acetone dried anterior pituitary powder, it is 10,720 units per 100 grams of dry gland.

In addition to the better yield of the hormone, the comparison of the purity of the product also speaks in favor of the acid acetone extraction method. On examining the figures in the fifth column, the purity of the product obtained by the alkaline alcoholic extraction method ranged from 1.75 mg of the product per pigeon unit to 15 mg per unit, while in the acid acetone method, it ranged from 0.125 mg to 0.60 mg per pigeon unit.

IV. PURIFICATION OF THE ACID ACETONE EXTRACT.

A. Purification Studies by Bates and Riddle Method.

The comparison of alkaline alcohol and acid acetone methods of extraction showed that the latter is much more efficient in that the amount of the hormone obtained is greater and the product obtained is purer. For the study of the purification of the hormone, therefore, a crude product was first prepared by the acid acetone extraction method and then the purification process of Bates and Riddle was followed. The aqueous solution of the crude lactogenic hormone was precipitated three times at pH 3.8 in the presence of sodium sulfate in 0.5% concentration. The third pH 3.8 precipitate was dissolved in distilled water with the aid of dilute sodium hydroxide, and the impure proteins were removed by precipitating at 70% concentration of ethyl alcohol in the presence of 0.15% sodium chloride and centrifuging off the precipitate. The precipitate still contained a considerable amount of the hormone and it was necessary to repeat the process of dissolution in distilled water with the aid of dilute sodium hydroxide and precipitating at 70% alcohol. From the combined supernatant fluid, the active principle was precipitated by 90% alcohol.

The above process gave about 24–26% recovery of the active principle. The product was obtained as a slightly grayish white powder and it gave one pigeon unit reaction at 0.6 mg daily dose.

This powder was dissolved by distilled water with the aid of dilute sodium hydroxide solution at pH 7.2 and passed through Berkfeld and Chamberland filters. When the filtrate thus obtained was injected subcutaneously into human subjects, there was no pain at the time of injection, but within twenty-four hours (usually six to seven hours after injection) a slight itching sensation was felt, and there was erythema and a slight rise in temperature at the site of injection. The severity of this symptom, however, depends upon the dosage and usually disappears after twenty-four hours.

B. Purification Studies by Lyons' Method.

The crude preparation was purified by the original method of Lyons (1937). The hormone solution was treated with ammonium hydroxide solution of 9% NH_3 concentration for three hours and then the active principle was precipitated by acetone at pH 8.0. The acetone precipitate thus obtained was dissolved in water and the portion which precipitated at pH 6.2 was centrifuged off and dissolved in dilute sodium hydroxide and assayed. From the supernatant the precipitates were obtained at pH 5.8 and pH 5.2. These precipitates were dissolved in dilute sodium hydroxide and assayed. The supernatant from pH 5.2 precipitate was precipitated by the addition of ammonium sulfate crystals to full saturation. The precipitate thus obtained was dialyzed to remove the salt and the substance remaining in the dialyzing sac was dissolved in dilute sodium hydroxide and assayed.

TABLE II.

The Assay of Fractions Obtained by Purification of the Crude Lactogenic Hormone by Lyons' Method.

Fractions	Yield in terms of dry substance (g)	Dry substance (in mgm.) equivalent to one pigeon unit	Total units	Percent recovered
Original solution	30.420	0.88	34.568	
pH 6.2 precipitate	0.500		trace	
pH 5.8 precipitate	2.604	0.63	4.166	12.1
pH 5.2 precipitate	4.828	0.25	19.312	55.9
Supernatant	1.078	2.50	413	1.2

The precipitate obtained at pH 5.2 was dissolved in distilled water with the aid of dilute alkaline solution and passed through Berkfeld and Chamberland filters but it still retained the property of inciting a local reaction at the site of injection.

It should be mentioned in passing, that the pH determination reported in this paper was made by the use of pH test paper sold by the Toyo Roshi Company and thus the figures reported here may not be accurate and may deviate by 0.2 to 0.4 from the true pH values.

C. Purification Studies by Repeated Isoelectric Precipitation.

A solution of crude lactogenic hormone containing 7,660 units in 1685 cc. was made to pH 6.2 using dilute sulphuric acid. A small amount of the precipitate formed was centrifuged off. The supernatant fluid was made to pH 5.8 and the precipitate formed was centrifuged off. The pH 5.8 precipitate thus obtained was purified five times by repeated isoelectric precipitation at the same pH and the final precipitate was dissolved by dilute alkaline solution and its potency was assayed. The supernatant liquid from pH 5.8 was made to pH 5.3, the precipitate was again centrifuged off and was purified by repeated precipitation at the same pH and its activity was assayed. The supernatant from pH 5.3 precipitate

TABLE III.
The Assay of the Fractions Obtained by Repeated Isoelectric Precipitation.

Fraction.	Total solid in gms contained in the fraction	No. of mgms. of dry substance equivalent to 1. P.U.	Total P.U. in the fraction	% in the fraction in terms of total P.U. of the orig. fraction
Original solution	29.15	1.25	23.320	100.00
pH 6.2 precipitate	0.29	1.25	228	0.98
pH 5.7 precipitate	6.34	0.63	10.139	43.48
pH 5.3 precipitate	2.05	0.43	4.824	20.69
(NH ₄) ₂ SO ₄ precipitate from supernatant	1.90	2.50	761	3.26

was then made to 50% concentration of ammonium sulfate by the addition of crystalline salt. The precipitate formed was filtered off, dialized and the dialysate was dissolved with the aid of a small amount of dilute sodium hydroxide solution and assayed for lactogenic activity. The results are tabulated in Table III.

From the above data it appears that most of the activity is found in the pH 5.7 and 5.3 precipitates. The isoelectric point of lactogenic hormone is stated to be pH 5.5 by Lyons (1937) and at pH 5.6 by Shipley, Stern and White (1937), while the recent electrophoretic study made by Li, et. al. (1939) place the value at pH 5.7. The fraction purified by isoelectric precipitation by us still retained its property of causing local reaction when it was injected into human subjects after passing through porcelain filters.

D. Purification Studies by Fractional Precipitation with Ammonium Sulfate.

Ammonium sulfate is one of the most common protein precipitants. Recently Evans, Uyei, Bartz and Simpson (1938) obtained good results in purification of growth hormone with this reagent. It is interesting to note what success can be attained in the purification of lactogenic hormone by the use of ammonium sulfate.

To the crude lactogenic hormone solution enough powdered ammonium sulfate was added to make its concentration 5%, and the precipitate thus formed was centrifuged off, dialized, dissolved in a little sodium hydroxide solution and the lactogenic hormone content was determined. To the supernatant fluid from the 5% ammonium sulfate precipitate, a further quantity of the salt was added so that its concentration reached 40%. The precipitate thus formed was filtered off, dialized, dissolved with a small amount of dilute sodium hydroxide and assayed. The results of the duplicate experiment showed the 5% ammonium sulfate contained from a trace of the hormone to 6% of the total active principle, showing it consisted mainly of the impure protein substance, whereas, the 40% ammonium sulfate precipitate contained 40% of the active principle in one case and 80% in the other sample, showing that

most of the active substance was found in the 40% ammonium sulfate precipitate. It was impossible, however, to fractionate the 40% ammonium sulfate precipitate into a purer fraction by the use of smaller concentrations of ammonium sulfate or to remove the principle which causes the local reaction when injected into human beings.

A few words must be said in regard to the phenomenon of causing local reaction when a lactogenic hormone solution is injected. John R. Ross (1938) in reporting the clinical use of prolactin manufactured by Messrs. Ayerst, McKenna and Harrison Ltd., Montreal, described the severe local reaction consisting of redness and induration varying in diameter from 2-15 cm. developed in 83% of the case. Werner (1938, 1939) also described the severe reactions obtained from its use in two articles. We have tested the samples of prolactin manufactured by both Messrs. Ayerst, McKenna and Harrison, Ltd. and by Eli Lilly and Co. and substantiated the statements of the above authors.

SUMMARY AND CONCLUSIONS.

1. A modified method of assaying lactogenic hormone based on the original method of Riddle, Bates and Dykeshorn is described. This method enables one to assay the hormone without sacrificing the pigeons.

2. Two methods of extracting the hormone, namely alkaline alcoholic and acid acetone methods were compared as to the efficiency of extraction and the purity of the product. By using the acetone soaked anterior pituitary gland, it was found that the acid acetone method of extraction was superior in giving a greater yield and a purer product.

3. Various methods of purification by using repeated isoelectric precipitation, fractional precipitation with ammonium sulfate, as well as the original methods of Bates and Riddle or Lyons were investigated. No product free from causing local reaction on injection was obtained from any of the methods studied.

BIBLIOGRAPHY.

- Ott, I. and Scott, J. C. (1910): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **8**, 48.
Stricker, P. and Grueter, F. (1928): *Comp. rend Soc. Biol.*, **99**, 1978.
Gardner, W. U. and Turner, C. W. (1933): *Mo. Agr. Exp. Sta. Research Bnl.* 196.
Riddle, O., Bates, R. W. and Dykeshorn, S. W. (1933): *Amer. J. Physiol.*, **105**, 191.
Lyons, W. R. (1937): *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **35**, 645
Bergman, A. J. and Turner, C. W. (1937): *J. Biol. Chem.*, **118**, 247.
Bates, R. and Riddle, O. (1935): *J. Pharm. Exp. Therap.*, **55**, 265.
White, A., Catchpole, H. R. and Long, C. N. H. (1937): *Science*, **86**, 82.
Rabald, A. und Voss, H. E. (1939): *Z. physiol. Chem.*, **261**, 71.
Lyons, W. R. (1937): *Cold Spring Harbor Symposia on Quant. Biol.*, **5**, 203.
Itoh, M., Hayatsu, S. and Uyeno, F. (1937): *Tokyo Izi Sinsi*, No. 3033, 1422.
Shipley, R. A., Stern, K. G. and White, A. J. (1937): *J. Exp. Med.*, **69**, 785.
Li, C. H., Lyons, W. R. and Evans, H. M. ((1939): *Science*, **90**, 622.
Evans, H. M., Uyei, N., Bartz, Q. and Simpson, M. E. (1938): *Endocrinol.*, **22**, 483.
Ross, John R. (1938): *Endocrinol.*, **22**, 429.
Werner, A. A. (1938-9): *Endocrinol.*, **19**, 2; **24**, 119.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DEN PARTIELLEN ABBAU DER PROTEINE.

IV. Mitteilung. Partielle Spaltung des Keratins.

VON

KAZUO OTSUJI.

(Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät zu Nagasaki.
Vorstand: Prof. Dr. T. Uchino.)

(Eingegangen am 13. April 1940)

EINLEITUNG.

Eine Reihe von Forschern haben bis jetzt verschiedenartige Versuche ausgeführt, um einen Einblick in die Konstitution der Proteine zu gewinnen. Die wichtigsten unter derartigen Versuchen sind die des partiellen Eiweissabbaus, die einerseits durch Säuren oder Alkalien und anderseits durch Fermente bewirkt wurden. E. Fischer hat zuerst die Meinung geäußert, dass die Proteine aus säureamidartig verknüpften Aminosäuren zusammengesetzt seien. Auf Grund der Tatsache, dass unter den Abbauprodukten Diketopiperazine aufzufinden sind, hat zuerst Abderhalden angenommen, dass im Eiweisskörper neben den Peptidbindungen Diketopiperazinringe vorkommen. Ssadikow und Zellinski, und Shibata haben dann behauptet, dass die Proteinmoleküle vorwiegend oder sogar ausschliesslich aus Diketopiperazinringen aufgebaut sind. In den Untersuchungen dieser Autoren ist dennoch die Möglichkeit des sekundären Auftretens der Diketopiperazine durch Wasserabspaltung aus Peptiden nicht ausgeschlossen. Ferner ist die Ausbeute an Anhydriden oft sehr gering, und wichtiger ist, dass alle diejenige Substanzen, welche neben den Anhydriden als Abbauprodukte auftreten, ganz ausser Acht gelassen worden sind.

Uchino(1934) hat in seiner Untersuchung über den partiellen Abbau des Seidenfibroins versucht, einerseits alle entstehenden Abbauprodukte lückenlos zu erforschen und anderseits die mit

dem Spaltungsvorgang stattfindenden Veränderungen der Bindungsweise der Aminosäuren zu verfolgen. Er hat das Seidenfibroin unter verschiedenen Versuchsbedingungen stufenweise hydrolysiert, die entstehenden Abbauprodukte in verschiedene Fraktionen zerlegt und die letzteren in bezug auf ihre chemische Zusammensetzung und ihr Mengenverhältnis miteinander verglichen. Anschliessend an diese Untersuchung hat Kunishige (1937) die Spaltungsversuche mit Gliadin und Konuma (1938) die mit Gelatine ausgeführt. Da es mir wünschenswert erscheint einen derartigen Versuch noch mit einem anderem Eiweisskörper weiterzuführen wurde in der vorliegenden Untersuchung ganz in analoger Weise die partielle Spaltung des Keratins unternommen. Für den Versuch diente das Keratin von Merck (dargestellt nach Dr. Unna). Es enthielt 8,28 Proz. Wasser und 10,54 Proz. Stickstoff (auf wasserfreie Substanz berechnet 11,49 Proz.).

I. SPALTUNG DES KERATINS MITTELS KONZENTRIERTER SCHWEFELSÄUREN UNTER KÄLTEANWENDUNG.

Zuerst wurde die Spaltung des Keratins mittels konzentrierter Schwefelsäuren wechselnder Konzentration unter Kälteanwendung ausgeführt. Es wurden sowohl konzentrierte, 70%ige und 50%ige Schwefelsäuren als auch 70%ige Säure, deren Wasser teilweise oder völlig mit Glycerin ersetzt worden ist, verwendet. Je 5 g Keratin wurden mit der zehnfachen Menge der Säuren versetzt und im Eisschrank aufbewahrt. Von Zeit zu Zeit wurde eine Probe entnommen, mit Wasser verdünnt und mit verdünnter Natronlauge neutralisiert. In dieser Lösung wurde der Aminostickstoff nach der Methode von Van Slyke und der Gesamtstickstoff mittels der Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Zugleich wurde die Biuretreaktion geprüft und auf diesem Wege wurde der Fortschritt der Spaltung des Keratins im Laufe von 300 Tagen verfolgt. Die Ergebnisse sind in Tabelle I und Fig. 1 angegeben.

Aus der Tabelle und Figur kann man ersehen, dass die Spaltung des Keratins durch Schwefelsäure bei Gegenwart einer gewissen Menge Wassers schneller vor sich geht als bei Verwendung der konzentrierten Säure. Falls das Wasser der ersteren teilweise

TABELLE I.

Spaltung des Keratins mit konzentrierter und 50-70%iger Schwefelsäure.
Aufbewahren im Eisschrank.

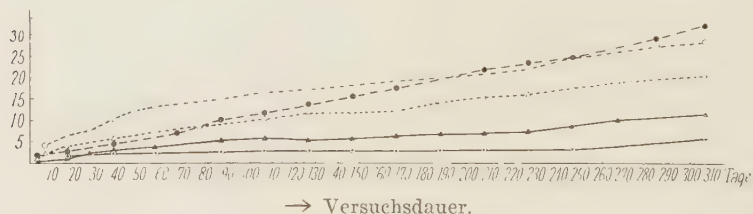
Versuchsdauer (Tage)	Spaltung mit konzentrierter H ₂ SO ₄		Spaltung mit 50%iger H ₂ SO ₄		Spaltung mit 70%iger H ₂ SO ₄		Spaltung mit 70%iger H ₂ SO ₄ , welche 30% Glycerin enthält.		Spaltung mit 70%iger H ₂ SO ₄ , welche 15% Glycerin und 15% H ₂ O enthält.	
	Biur. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.
4				1,43				0,25		1,16
7						3,84		0,52		2,38
17		1,70		2,38		6,11		1,27		4,30
27						7,27		2,46		
37		2,13		4,60		10,47		3,15		5,78
47		2,22		5,42		12,16				
57		2,48				13,04		4,09		7,43
67			+	7,24						
77										8,63
87		2,50	+	9,94		14,90		5,30		
107	+	2,62	+	11,47	+	16,41	+	5,66	+	10,08
127	+	2,81	+	13,63	+	16,70	+	5,58	+	11,06
147	+	2,76	+	15,16			+	5,70	+	11,79
167	+	2,68	+	17,18	+	19,17	+	6,05	+	12,34
187	+	2,80			+	19,59	+	6,34	+	14,40
207	+	2,90	+	21,15			+	7,22	+	15,62
227			+	22,56	+	22,34	+	7,55	+	16,34
247	+	4,34	±	24,12	+	24,18	+	8,87	+	17,64
267							+	10,11	+	19,41
287			±	28,72	±	27,60				
307	+	5,56	±	31,36	±	28,14	+	11,15	+	20,61

Fig. 1.

Spaltung des Keratins mit konzentrierter und 50–70%iger Schwefelsäure.
Aufbewahren im Eisschrank.

- Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure.
- Spaltung mit 50%iger Schwefelsäure.
- Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure welche 15% Wasser und 15% Glycerin enthält.
- Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure welche 30% Glycerin enthält.
- Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure.

Amino-N zum
Gesamt-N Proz.



oder völlig mit Glycerin ersetzt wird, so nimmt die Hydrolysen-
geschwindigkeit merklich ab. Ferner ergab es sich, dass entgegen
den Verhältnissen bei der Gelatine (Konuma) die Aufspaltung
des Keratins mit 70%iger Säure schneller erfolgte als die mit
50%iger Säure. Dieser Umstand beruht darauf, dass das Keratin
in 50%ige Säure nicht alsbald vollständig in Lösung ging, sondern
ein Teil davon sich als ungelöster Rückstand am Gefäßboden ab-
setzte. Mit der Zeit wurde das Keratin aufgelöst und nach 200
Tagen überschritt die Kurve der 50%igen Säure diejenige der
70%igen. Die Spaltung geschieht also ähnlich wie beim Seiden-
fibroin und der Gelatine, jedoch viel langsamer und erreicht
niedrigere Endwerte. Zur Veranschaulichung dieser Verhältnisse
sind in Fig. 2 die Resultate der Spaltung des Keratins zusammen
mit denjenigen des Seidenfibroins (Uchino, 1934) und der
Gelatine (Konuma, 1938) aufgezeichnet.

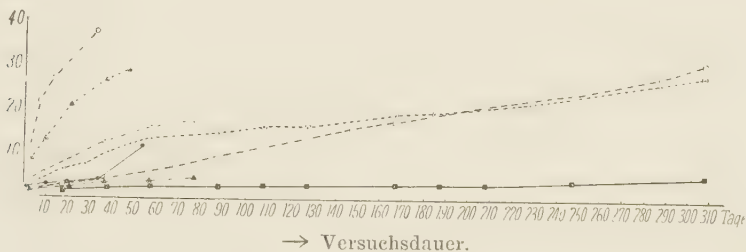
Wie in den früheren Mitteilungen mehrmals bemerkt worden
ist, lassen uns die Resultate der Spaltungsversuche der Proteine
durch konzentrierte Schwefelsäure vermuten, dass die Proteine ihre
Aufspaltung zuerst nur dann erfahren, wenn eine gewisse Menge
Wassers zugegen ist, indem ihre Polypeptidketten unter Wasser-
eintritt hydrolysiert werden.

Fig. 2.

Spaltung des Seidenfibroins (Uchino, 1934), der Gelatine (Konuma, 1938) und des Keratins (Otsuji) mit konzentrierter und 50–70%iger Schwefelsäure. Aufbewahren im Eisschrank.

- | | | |
|-------|---|----------------|
| ○---○ | Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure | } Seidenfibrin |
| ●—● | Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure | |
| △---△ | Spaltung mit 50%iger Schwefelsäure | } Gelatine |
| ▲---▲ | Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure | |
| — | Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure | } Keratin |
| ○---○ | Spaltung mit 50%iger Schwefelsäure | |
| ●—● | Spaltung mit 70%iger Schwefelsäure | |
| — | Spaltung mit konzentrierter Schwefelsäure | |

Amino-N zum
Gesamt-N Proz.



II. SPALTUNG DES KERATINS DURCH VERDÜNNTE SALZSÄURE.

5 g Keratin wurden mit der zehnfachen Menge von 0,07, 0,10, 0,15, 0,20 und 0,30 *n*-Salzsäure im Autoklaven auf 170° erhitzt und der Verlauf der Spaltung folgendermassen verfolgt. Im Intervall von je 2½ Stunden wurde dem Reaktionsgemisch eine Probe entnommen, filtriert und mit 1/10 *n*-Natronlauge unter Anwendung von Methylrot als Indikator neutralisiert. In dieser Lösung wurde die Biuretreaktion geprüft und der Gesamtstickstoff mittels Mikrokjeldahlmethode bestimmt. Das Ammoniak wurde nach Folin unter Zusatz von gleicher Menge gesättigter Sodalösung durch den Luftstrom bei 50° abdestilliert und titrimetrisch bestimmt. In der so erhaltenen von Ammoniak befreiten Lösung wurde dann der Aminostickstoff nach der Methode von Van Slyke bestimmt. Die Methode von Linderström-Lang, welche in den früheren Mitteilungen zur Bestimmung des Amino-

TABELLE IIa.
Spaltung des Keratins mit verdünnter Salzsäure bei 170°.

Versuchsdauer (Stunden)	Spaltung mit 0,07 n-HCl				Spaltung mit 0,10 n-HCl				Spaltung mit 0,15 n-HCl				Spaltung mit 0,20 n-HCl				Spaltung mit 0,30 n-HCl			
	Blutr. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Blutr. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Blutr. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Blutr. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Blutr. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Blutr. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.		
2,5	+	13,14	16,14	+	14,84	15,64	+	15,85	16,08	+	17,34	15,35	+	21,99	17,57					
5,0	+	14,20	18,48	+	15,04	20,97	+	17,07	20,01	+	17,92	20,00		23,29	19,52					
7,5	+	16,24	21,93	+	16,19	23,84	+	18,31	23,73		18,59	22,93		25,29	22,63					
10,0	+	14,78	23,64	+	17,76	25,10		17,98	26,42		18,34	26,39		24,20	23,00					
12,5	+	14,71	27,91	+	16,83	31,11		18,05	31,59		17,48	29,00		22,40	28,33					
15,0	+	12,83	31,07	-	17,06	30,69		17,41	31,00		15,63	31,11		22,24	30,04					
17,5	-	10,80	32,84	-	16,09	32,55		16,43	32,51		15,48	31,80		17,52	33,84					
20,0				-	13,20	34,90		12,97	30,19		12,12									

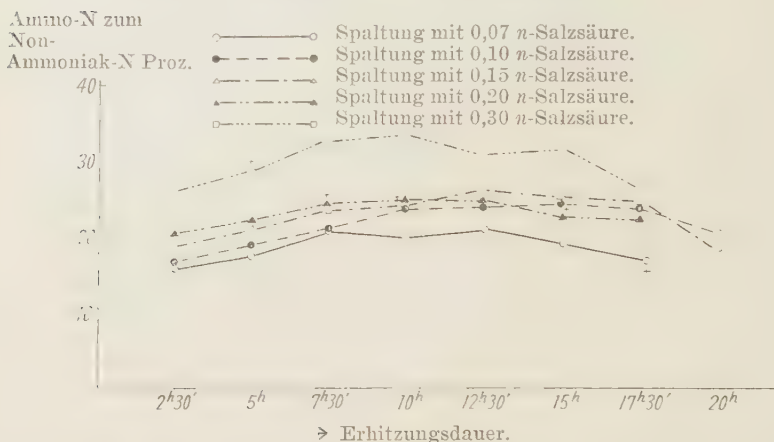
TABELLE IIb.

Spaltung des Keratins mit verdünnter Salzsäure bei 170°.

Versuchsdauer (Stunden)	Spaltung mit 0,07 n-HCl		Spaltung mit 0,10 n-HCl		Spaltung mit 0,15 n-HCl		Spaltung mit 0,20 n-HCl		Spaltung mit 0,30 n-HCl	
	Biur. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Biur. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.
2,5	+	15,67	+	17,59	+	18,89	+	20,53	+	26,52
5,0	+	17,42	+	19,03	+	21,34	+	22,40	—	28,94
7,5	+	20,80	+	20,98	±	24,01	—	24,12	—	32,69
10,0	+	19,36	+	23,71	—	24,44	—	24,52	—	33,61
12,5	+	20,69	±	24,43	—	26,39	—	24,62	—	31,25
15,0	+	18,63	—	24,61	—	25,23	—	22,69	—	31,79
17,5	—	16,08	—	23,85	—	24,34	—	22,70	—	26,48
20,0			—	20,28	—	18,58				

Fig. 3.

Spaltung des Keratins mit verdünnter Salzsäure bei 170°.



stickstoffes diente, gab im Falle des Keratins auffallend zu hohe Werte. Wie dieser Umstand zu deuten ist, lässt sich zurzeit noch nicht sicher sagen. Die Versuchsergebnisse sind in Tabelle IIa zusammengestellt. In Tabelle IIb und Fig. 3 sind die Prozentwerte des Aminostickstoffes in bezug auf den Non-Ammoniakstickstoff angegeben.

Das Keratin löste sich mit der Zeit allmählich jedoch nicht vollständig auf und es blieb nach langdauerndem Erhitzen stets ein ungelöster schwarzbrauner Rückstand zurück. Die Lösung färbte sich dabei gelbbraun. Aus der Figur kann man ersehen, dass bei der Säurehydrolyse des Keratins die Menge der freigelegten Aminogruppen im Vergleich zu übrigen Proteinen verhältnismässig klein blieb und höchstens 20–25 Proz. des Non-Ammoniakstickstoffes erreichte. Ferner zeigte es sich, dass die Aminostickstoffkurven mit der Zeit ein allmähliches Absinken aufweisen, nachdem sie ihre maximale Werte erreicht haben. Diese auffallende Erscheinung rührt wohl daher, dass die Peptide eine Umwandlung in Diketopiperazine erlitten.

Bei der Spaltung des Keratins trat eine beträchtliche Menge von Ammoniak auf, dessen Menge 30–35 Proz. des Gesamtstickstoffes erreichte.

Das Kreuzzeichen auf einzelnen Kurven in Fig. 3. zeigt den Zeitpunkt an, zu welchem die Biuretreaktion der Reaktionsflüssigkeit eben verschwand.

Es wurde von Uchino festgestellt, dass bei der Säurehydrolyse des Seidenfibroins die Aminostickstoffkurve zunächst einen steilen Zuwachs zeigt und danach mit der Zeit annähernd horizontal verläuft. Das gleiche gilt für die Gelatine (Konuma). In diesen Fällen bildete sich eine beträchtliche Menge von Anhydriden, indem die zuerst durch hydrolytische Spaltung auftretenden Peptide sich unter sekundärem Ringschluss in Diketopiperazine umwandelten. Im Falle des Gliadins zeigte sich eine schnelle und stetige Zunahme des Aminostickstoffes (Kunishige). Hier entstand gleichfalls eine grosse Menge von Peptiden, welche sich dennoch nur in geringem Masse in Anhydride verwandelte. Beim Keratin fand der Zuwachs an freien Aminogruppen von vornherein nur in geringem Grade statt. Dies besagt, dass sich nur eine geringe Menge von Peptiden bildete. Dementsprechend geschah auch eine geringfügige Anhydridbildung, wie es in dieser Mitteilung weiter unten gezeigt werden wird.

III. SPALTUNG DES KERATINS DURCH VERDÜNNTE NATRONLAUGE.

Das Keratin wurde dann mit der zehnfachen Menge von 0,10, 0,20, 0,30 und 0,40 *N*-Natronlauge im Autoklaven auf 170° erhitzt und der Verlauf der Spaltung in gleicher Weise wie bei der Säurespaltung verfolgt. Die Resultate sind in Tabelle IIIa angegeben. In Tabelle IIIb und Fig. 4 sind die Prozentwerte des Aminostickstoffes in bezug auf den Non-Ammoniakstickstoff aufgezeichnet.

Bei der Alkalispaltung ging der grössere Teil des Keratins in Lösung, wobei sich die Flüssigkeit schwarzbraun färbte. Da das bei der Alkalibehandlung in Freiheit gesetzte Ammoniak zum Teil aus dem Reaktionsgemisch entwich, steigerten sich die Prozentwerte des Ammoniakstickstoffes nicht so hoch wie bei der Säurespaltung. Die Prozentwerte des Aminostickstoffes zum Non-Ammoniakstickstoff in der Reaktionsflüssigkeit waren sehr gering

TABELLE IIIa.
Spaltung des Keratins mit verdünnter Natronlauge bei 170°.

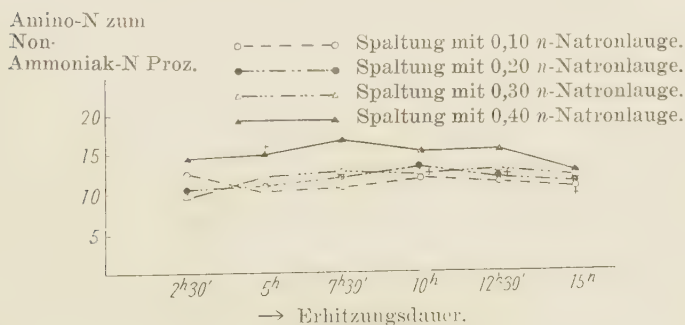
Versuchsdauer (Stunden)	Spaltung mit 0,10 n-NaOH				Spaltung mit 0,20 n-NaOH				Spaltung mit 0,30 n-NaOH				Spaltung mit 0,40 n-NaOH		
	Bier. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.
2,5	+	11,82	11,22	+	9,83	9,27	+	8,88	13,34	+	12,12	18,51			
5,0	+	9,42	13,56	+	9,62	14,07	+	10,46	16,50	+	12,50	17,43			
7,5	+	9,60	14,60	+	10,93	15,30	+	9,93	21,03	+	14,51	15,52			
10,0	+	10,04	19,60	+	11,10	18,58	+	10,37	17,48	+	13,38	13,45			
12,5	+	9,84	18,82	+	9,84	18,48	+	10,50	20,88	+	14,03	13,68			
15,0	+	8,56	20,79	+	9,32	19,52	+	10,01	17,26	+	11,11	13,11			

TABELLE IIIb.
 Spaltung des Keratins mit verdünnter Natronlauge bei 170°.

Versuchsdauer (Stunden)	Spaltung mit 0,10 n-NaOH		Spaltung mit 0,20 n-NaOH		Spaltung mit 0,30 n-NaOH		Spaltung mit 0,40 n-NaOH	
	Bier. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.	Bier. Reak.	Amino-N zum Non- Ammoniak-N Proz.
2,5	+	13,13	+	10,83	+	10,25	+	14,87
5,0	+	10,90	+	11,20	+	12,53	—	15,14
7,5	+	11,24	+	12,90	±	12,57	—	17,18
10,0	+	12,49	+	13,63	—	12,57	—	15,46
12,5	±	12,12	—	12,07	—	13,27	—	15,76
15,0	—	10,81	—	11,58	—	12,10	—	12,79

Fig. 4.

Spaltung des Keratins mit verdünnter Natronlauge bei 170°.



und betrugen nur 10–15 Proz. Aus den Resultaten der Säure- und Alkalispaltung geht hervor, dass das Keratin gegen chemische Eingriffe einen merklich stärkeren Widerstand leistet als die übrigen Proteine.

IV. FRAKTIONIERUNG DER ABBAUPRODUKTE DES KERATINS.

Um vollständige Auskunft über die Frage zu erhalten, in welchem Mengenverhältnis die freien Aminosäuren, Peptide und

TABELLE IV.

Stickstoffverteilung in den Abbauprodukten des Keratins, 10 stündige Spaltung von 30 g Keratin mit 0,10 n-HCl bei 170°.

	Ausbeute	Amino-N zum Gesamt-N Proz.	Ammoniak-N zum Gesamt-N Proz.	B. Biuretreaktion C. Carbylreaktion M. Millonsche Reaktion N. Nitroprussidreaktion S. Schwefelbleireaktion
Hydrolysat				
Rückstand	(5,70 g) 0,4469 g als N			
Filtrat	Gesamt-N = 7,84%			
In Lösung gegang. Teil	3,081 g als N	16,63%	21,05%	B(+) C(+) M(+) N(-) S(-)
Fraktion A				C(±)
Beim Einengen abgeschiedene Fraktion	(0,210 g) 0,0296 g als N Gesamt-N = 10,75%			
Fraktion B				
Essigätherauszug	0,4170 g als N	0,00%	0,00%	B(-) C(±) M(±) N(-) S(-)
Fraktion B ₁	(0,530 g) 0,0625 g als N			
In Wasser schwer löslicher Teil	Gesamt-N = 11,79%			
Fraktion B ₂				
In wasser löslicher Teil	0,2938 g als N	0,34%	0,36%	B(-) C(±) M(±) N(-) S(-)
Harzige Masse	(0,350 g) 0,0411 g als N Gesamt-N = 11,75%	9,30%	0,00%	
Fraktion C				
Restlösung des Essigätherauszugs	2,412 g als N	21,28%	29,02%	B(+) C(+) M(+) N(±) S(-)
Fraktion D				
In Alkohol schwer löslicher Teil	(2,771 g) 0,1582 g als N			
Fr. D ₁ : Durch PWS fällbarer Teil	Gesamt-N = 5,71%	19,88%	39,22%	B(-) C(±) M(-) N(-) S(-)
Fr. D ₂ : Durch PWS nicht fällbarer Teil	0,030 g als N	25,50%	0,00%	B(-) C(-) M(-) N(-) S(-)
Fraktion E				
Von Fraktion D abgetrennte alkoholische Lösung	0,021 g als N	80,16%	0,00%	B(-) C(-) M(-) N(-) S(-)
Fr. E ₁ : Durch PWS fällbarer Teil	2,071 g als N	20,94%	10,27%	B(+) C(+) M(±) N(+) S(±)
Fr. E ₂ : Durch PWS nicht fällbarer Teil	0,7480 g als N	18,42%	0,00%	B(+) C(±) M(±) N(-) S(±)
	0,7620 g als N	33,80%	0,00%	B(-) C(-) M(±) N(+) S(±)

Diketopiperazine entstanden sind, wurden ganz in analoger Weise wie in den früheren Mitteilungen die Abbauprodukte, welche durch partielle Spaltung des Keratins mit 0,10, 0,15 und 0,20 n -Salzsäure, sowie 0,10, 0,20 und 0,30 n -Natronlauge erhalten wurden, in eine Reihe von Fraktionen zerlegt und ihre chemische Zusammensetzung ermittelt. In Tabelle IV ist das Ergebnis der Fraktionierung derjenigen Produkte gezeigt, welche beim Abbau mit 0,10 n -Salzsäure erhalten wurden.

Das Experiment wurde wie folgt ausgeführt. 30 g Keratin wurden mit der zehnfachen Menge von 0,10 n -Salzsäure im Autoklaven 10 Stunden lang auf 170° erhitzt. Das ungelöst gebliebene Keratin wurde abfiltriert und getrocknet. Es wog 5,70 g und enthielt 7,84 Proz. Stickstoff. Das Filtrat, das den aufgelösten Anteil des Keratins enthält, wurde vorsichtig mit 1 n -Natronlauge gegen Lackmuspapier neutralisiert und bei der Temperatur von 40° unter vermindertem Druck eingeeengt. Dabei schied sich eine krystallinische Substanz aus. Sie wurde Fraktion A genannt. Die Ausbeute betrug 0,210 g und der Stickstoffgehalt 10,75 Proz. Das Produkt zeigte weder Biuret- noch Millonische Reaktion. Es löst sich leicht in Methylalkohol, aber schwer in Wasser. Die alkoholische Lösung gab mit gesättigter alkoholischer Pikrinsäurelösung und 1 n -Natronlauge tiefrote Carbonylreaktion nach Sasaki. Diese Fraktion ist ohne Zweifel die des Diketopiperazins. Es sublimierte leicht und das aus Wasser umkrystallisierte Produkt schmolz im geschlossenen Röhrchen bei 255°. Wegen des Mangels an Substanz war die Elementaranalyse nicht ausführbar.

Das von der Fraktion A abgetrennte Filtrat wurde im Flüssigkeitsextraktor nach Kumagawa-Suto 35 Stunden mit Essigäther ausgezogen. Aus der Essigätherlösung schied sich am Gefäßswand eine harzige Masse ab, welche abfiltriert und getrocknet wurde. Die Ausbeute betrug 0,35 g und der Stickstoffgehalt 11,76 Proz. Das Produkt war unlöslich in Säure, wohl aber in Natronlauge und Alkohol. Der beim Abtreiben des Lösungsmittels verbleibende Rückstand der Essigätherlösung (Fraktion B) gab starke Carbonylreaktion. Die Biuretreaktion fiel negativ aus. Ferner sind in dieser Fraktion weder freie Aminosäuren noch Ammoniak vor-

handen. Sie scheint folglich fast ausschliesslich aus Diketopiperazinen zu bestehen. Es muss noch bemerkt werden, dass diese Anhydridfraktion auffallend starke Millonsche Reaktion gab. Der in Wasser schwer lösliche Anteil der Fraktion B wurde Fraktion B₁ genannt und derjenige, welche in Wasser löslich ist, Fraktion B₂. Die Fraktion B₁ wies ganz dieselbe Beschaffenheit wie die Fraktion A auf. Sie gab starke Carbonylreaktion. Die Biuretreaktion fiel negativ aus. Sie sublimiert ausserordentlich leicht und das aus Wasser umkrystallisierte Produkt schmolz im geschlossenen Röhrchen bei 255°. Für die Analyse wurde es bei 110° in Vakuum getrocknet.

0,0112 g Substanz gaben 0,0261 g CO₂ und 0,0098 g H₂O

Für C₁₂H₂₂N₂O₂

	Ber.	Gef.
C	63,59	63,55
H	9,81	9,79
N	12,39	12,03

(Nach der Mikrokjeldahlmethode bestimmt.)

Das Analysenergebnis spricht dafür, dass ein Leucinimid vorliegt. Der Schmelzpunkt wurde dennoch erheblich niedriger gefunden als das Produkt von Kunishige (1937).

Die braune Restlösung der Essigätherextraktion (Fraktion C) wies starke Fluoreszenz auf. Die Biuretreaktion war positiv, wogegen die Carbonylreaktion sehr schwach war. Der Aminostickstoff betrug 21,28 Proz. und der Ammoniakstickstoff 29,02 Proz. des Gesamtstickstoffes. Daraus folgt, dass diese Fraktion vorwiegend aus Peptiden, freien Aminosäuren und Ammoniumsalzen besteht. Zur weiteren Fraktionierung wurde die Lösung bis zum Sirup eingeeengt, mit der neunfachen Menge absoluten Alkohols versetzt und im Eisschrank stehen gelassen. Nach einem Tage wurde der entstandene Niederschlag abgesaugt, mit 90%igem Alkohol gewaschen und getrocknet (Fraktion D). Das Filtrat und die Waschungen wurden vereinigt und Fraktion E genannt.

Die Fraktion D stellt ein braunes Pulver dar. Es zeigte keine Biuretreaktion. Der Aminostickstoff machte 19,88 Proz. und das Ammoniakstickstoff 39,22 Proz. des Gesamtstickstoffes aus. Diese Fraktion scheint folglich aus Ammoniumsalz, freien Aminosäuren

und niederen Peptiden zu bestehen. Dagegen zeigte der von dem Lösungsmittel befreite Rückstand der Fraktion E positive Biuretreaktion. In diesem Rückstand betrug der Aminostickstoff 20,94 Proz. und der Ammoniakstickstoff 10,27 Proz. des Gesamtstickstoffes.

Beide Fraktionen D und E wurden in 5% igen schwefelsauren Lösungen mit konzentrierter Phosphorwolframsäurelösung versetzt bis kein Niederschlag mehr entstand. Der Niederschlag wurde dann mit Baryt zerlegt. Dabei roch die barytalkalische Lösung stark nach Ammoniakgas, indem das letztere aus der Lösung vertrieben wird, so dass die mit Phosphorwolframsäure fällbare Fraktionen (D_1 und E_1) sich völlig frei von Ammoniak erwiesen. Die beiden Mutterlaugen, welche den mit der Phosphorwolframsäure nicht fällbaren Anteil enthalten, wurden von dem Überschuss dieser Säure und der Schwefelsäure mit Baryt befreit (Fraktion D_2 und E_2). Auch bei dieser Operation wurde das Ammoniak von diesen Fraktionen befreit. Die Stickstoffverteilung in den Fraktionen D_1 , D_2 , E_1 und E_2 ist in Tabelle IV angegeben. Daraus folgt, dass die Fraktion D_2 grösstenteils aus freien Aminosäuren besteht, während die Fraktionen D_1 und E_2 der Hauptmenge nach Gemische von niederen Peptiden darstellen. Nur die Fraktion E_1 zeigt positive Biuretreaktion. Dies besagt, dass in der letzteren Fraktion höhere Peptide zugegen sind.

Auf ganz gleiche Weise wurde je 30 g Keratin mit 0,15 und 0,20 n-Salzsäure, sowie 0,10, 0,20 und 0,30 n-Natronlauge hydrolysiert und die entstehenden Abbauprodukte fraktioniert. Die Ergebnisse sind in Tabelle V und VI zusammengestellt.

Aus Tabelle V und VI kann man ersehen, dass unter den Fraktionen der Abbauprodukte A, B_1 und B_2 fast ausschliesslich aus Diketopiperazinen bestehen, während die übrigen nur freie Aminosäuren und Peptide enthalten. Um Überblick über das Mengenverhältnis der in den Abbauprodukten auftretenden Anhydriden zu gewinnen, wurden in der folgenden Tabelle VII die Prozentwerte des Anhydridstickstoffes bezogen auf den Gesamtstickstoff des zur Spaltung verwendeten Keratins, und zugleich solche Werte von Seidenfibroin (Uchino), Gliadin (Kunishige)

TABELLE

Stickstoffverteilung in den
10 stündige Spaltung von 30 g Keratin
B. Biuretreaktion, C. Carbonylreaktion, M. Millionsche Reaktion,

Säure- und Alkali- konzentration		0,10 n		
Fraktionen				
Hydrolysat	Rückstand	(5,70 g) 0,4469 g als N		
		Gesamt-N = 7,84%		
	Filtrat	3,081 g als N	B (+)	N (-)
	In Lösung gegang. Teil	Amino-N zum Ges.-N	16,63%	C (+)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	21,05%	M (+)
Fraktion A Beim Einengen abgeschiedene Fraktion		(0,210 g) 0,0226 g als N	C (+)	
		Gesamt-N = 10,75%	In alkoholische Lösung. Sublimation (+)	
Fraktion B Essigätherauszug		0,4174 g als N	B (-)	N (-)
		Amino-N zum Ges.-N	0,00%	C (##)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (##)
Fraktion B ₁ In Wasser schwer löslicher Teil		(0,530 g) 0,0625 g als N	B (-)	
		Gesamt-N = 11,79%	C (##)	Subl. (##)
			M (##)	
Fraktion B ₂ In Wasser löslicher Teil		0,2938 g als N	B (-)	N (-)
		Amino-N zum Ges.-N	0,34%	C (##)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,36%	M (+)
Harzige Masse		(0,350 g) 0,0411 g als N	B (-)	N (-)
		Gesamt-N = 11,75%	C (+)	S (-)
		Amino-N zum Ges.-N	9,31%	M (+)
Fraktion C Restlösung des Essigäther- auszuges		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	
		2,412 g als N	B (+)	N (±)
		Amino-N zum Ges.-N	21,28%	C (+)
Fraktion D In Alkohol schwer löslicher Teil		Ammoniak-N zum Ges.-N	29,02%	M (+)
		(2,771 g) 0,1582 g als N	B (-)	N (-)
		Gesamt-N = 5,71%	C (±)	S (±)
Fr. D ₁ : Durch PWS fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	19,88%	M (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	39,22%	
		0,030 g als N	B (-)	N (-)
Fr. D ₂ : Durch PWS nicht fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	25,50%	C (±)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (-)
		0,021 g als N	B (-)	N (-)
Fraktion E Von Fr. D abgetrennte alkoholische Lösung		Amino-N zum Ges.-N	80,16%	C (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (-)
		2,071 g als N	B (+)	N (+)
Fr. E ₁ : Durch PWS fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	20,94%	C (+)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	10,27%	M (±)
		0,7480 g als N	B (+)	N (-)
Fr. E ₂ : Durch PWS nicht fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	18,42%	C (±)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (±)
		0,7620 g als N	B (-)	N (+)
		Amino-N zum Ges.-N	33,80%	C (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (±)

Untersuchungen über den partiellen Abbau der Proteine.—IV. 399

V.

Abbauprodukten des Keratins.

mit 0,10, 0,15 und 0,20 *n*-Salzsäure bei 170°.

N. Nitroprussidreaktion, S. Schwefelbleireaktion.

Salzsäure							
0,15 <i>n</i>				0,20 <i>n</i>			
(5,80 g) 0,4390 g als N				(4,85 g) 0,328 g als N			
Gesamt-N = 7,56%				Gesamt-N = 6,77%			
3,185 g als N		B (—)	N (+)	3,231 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	22,02%	C (⦿)		Amino-N zum Ges.-N	21,80%	C (⦿)	S (±)
Ammoniak-N zum Ges.-N	21,33%	M (+)		Ammoniak-N zum Ges.-N	21,18%	M (+)	
(0,193 g) 0,0247 als N				(0,360 g) 0,0355 g als N			
Gesamt-N = 12,78%				Gesamt-N = 9,85%			
In alkoholische Lösung. Sublimation (⦿)				In alkoholische Lösung. Sublimation (⦿)			
0,3945 g als N		B (—)	N (+)	0,4355 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	0,00%	C (⦿)	S (⦿)	Amino-N zum Ges.-N	6,66%	C (⦿)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (⦿)		Ammoniak-N zum Ges.-N	2,50%	M (⦿)	
(0,390 g) 0,0463 g als N				(0,536 g) 0,0620 g als N			
Gesamt-N = 11,87%				Gesamt-N = 11,56%			
C (⦿) Subl. (⦿)				C (⦿) Subl. (⦿)			
M (+)				M (⦿)			
0,3357 g als N		B (—)	N (±)	0,2976 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	0,47%	C (⦿)	S (+)	Amino-N zum Ges.-N	0,48%	C (⦿)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,25%	M (⦿)		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,26%	M (+)	
(0,420 g) 0,0487 g als N				(0,334 g) 0,0379 g als N			
Gesamt-N = 11,60%				Gesamt-N = 11,36%			
Amino-N zum Ges.-N	13,30%	M (+)		Amino-N zum Ges.-N	9,48%	M (+)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,98%			Ammoniak-N zum Ges.-N	2,05%		
2,643 g als N		B (±)	N (?)	2,591 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	19,75%	C (⦿)	S (+)	Amino-N zum Ges.-N	26,60%	C (+)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	20,33%	M (⦿)		Ammoniak-N zum Ges.-N	24,76%	M (+)	
(3,808 g) 0,2262 g als N				(5,11 g) 0,2632 g als N			
Gesamt-N = 5,94%				Gesamt-N = 5,15%			
Amino-N zum Ges.-N				Amino-N zum Ges.-N			
Ammoniak-N zum Ges.-N				Ammoniak-N zum Ges.-N			
0,0275 g als N		B (—)	N (—)	0,0416 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	45,90%	C (—)	S (—)	Amino-N zum Ges.-N	33,26%	C (±)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (—)		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (—)	
0,0372 g als N		B (—)	N (—)	0,0651 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	84,16%	C (—)	S (—)	Amino-N zum Ges.-N	82,01%	C (±)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (—)		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (±)	
2,036 g als N		B (—)	N (+)	2,120 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	20,81%	C (⦿)	S (+)	Amino-N zum Ges.-N	29,10%	C (+)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	13,33%	M (±)		Ammoniak-N zum Ges.-N	8,31%	M (+)	
0,3214 g als N		B (+)	N (—)	0,8035 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	16,58%	C (±)	S (—)	Amino-N zum Ges.-N	28,15%	C (+)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (±)		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (±)	
0,7169 g als N		B (—)	N (+)	0,7950 g als N		B (—)	N (—)
Amino-N zum Ges.-N	48,54%	C (±)	S (?)	Amino-N zum Ges.-N	55,43%	C (±)	S (—)
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (±)		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (+)	

TABELLE

Stickstoffverteilung in den
10 stündige Spaltung von 30 g Keratin
B. Biuretreaktion, C. Carbonylreaktion, M. Millonsche Reaktion,

Säure- und Alkali- konzentration		0,10 n			
Fraktionen					
Rückstand		(2,18 g) 0,0948 g als N			
Hydrolysat		Gesamt-N = 4,35%			
Filtrat		3,230 g als N	B (+)	N (-)	
In Lösung gegang. Teil		Amino-N zum Ges.-N	12,31%	C (H)	S (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	16,43%	M (H)	
Fraktion A		(0,375 g) 0,0401 g als N			
Beim Einengen		Gesamt-N = 10,68%			
abgeschiedene Fraktion		C (+) In alkoholische Lösung. Sublimation (-)			
Fraktion B		0,421 g als N			
Essigätherauszug		Amino-N zum Ges.-N	3,64%	C (H)	S (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	M (H)	
Fraktion B ₁		0,138 g) 0,0129 g als N			
In Wasser schwer löslicher Teil		Gesamt-N = 9,38%			
		B (-) C (H) Sabl. (+) M (H)			
Fraktion B ₂		0,2486 g als N			
In Wasser löslicher Teil		Amino-N zum Ges.-N	1,78%	C (H)	S (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	1,16%	M (H)	
		(1,200 g) 0,0953 g als N			
Harzige Masse		Gesamt-N = 7,94%			
		Amino-N zum Ges.-N	7,06%	M (H)	
		Ammoniak-N zum Ges.-N	3,85%		
Fraktion C		2,585 g als N			
Restlösung des Essigäther-		Amino-N zum Ges.-N	12,35%	B (+)	N (-)
auszuges		Ammoniak-N zum Ges.-N	11,92%	C (+)	S (-)
		Gesamt-N = 8,39%			
Fraktion D		(0,840 g) 0,0705 g als N			
In Alkohol schwer löslicher Teil		Gesamt-N = 8,39%			
		Amino-N zum Ges.-N	12,02%	Reaktion unklar	
		Ammoniak-N zum Ges.-N	1,09%		
Fr. D ₁ : Durch PWS		0,0135 g als N			
fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	22,81%	B (+)	N (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	C (H)	S (-)
Fr. D ₂ : Durch PWS nicht		0,0140 g als N			
fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	45,03%	B (-)	N (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	C (-)	S (-)
Fraktion E		2,2955 g als N			
Von Fr. D abgetrennte		Amino-N zum Ges.-N	14,15%	B (+)	N (-)
alkoholische Lösung		Ammoniak-N zum Ges.-N	6,55%	C (+)	S (-)
		Gesamt-N = 6,55%			
Fr. E ₁ : Durch PWS		0,7712 g als N			
fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	14,40%	B (H)	N (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	C (+)	S (-)
Fr. E ₂ : Durch PWS nicht		0,7721 g als N			
fällbarer Teil		Amino-N zum Ges.-N	32,43%	B (H)	N (-)
		Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%	C (+)	S (-)

Untersuchungen über den partiellen Abbau der Proteine.—IV. 401

VI.

Abbauprodukten des Keratins.

mit 0,10, 0,20 und 0,30 *n*-Natronlauge bei 170°.

N. Nitroprussidreaktion, S. Schwefelbleireaktion.

Natronlauge

0,20 <i>n</i>				0,30 <i>n</i>			
(1,22 g) 0,0754 g als N				(2,52 g)			
Gesamt-N = 6,18%							
3,167 g als N	B (+)	N (—)		3,012 g als N	B (±)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	17,10% C (+)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	24,37% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	13,12% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	10,51% M (±)		
(0,295 g) 0,0175 g als N	C (+)			(0,250 g) 0,0174 g als N	C (+)		
Gesamt-N = 5,94%	In alkoholische Lösung.			Gesamt-N = 6,97%	In alkoholische Lösung.		
	Sublimation (—)				Sublimation (—)		
0,345 g als N	B (—)	N (—)		0,1939 g als N	B (—)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	0,00% C (±)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	5,48% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)		
	B (—)				B (—)		
(0,093 g) 0,0089 g als N	C (±) Subl. (+)			(0,070 g) 0,0071 g als N	C (±) Subl. (+)		
Gesamt-N = 9,52%	M (±)			Gesamt-N = 10,15%	M (±)		
0,1962 g als N	B (—)	N (—)		0,1856 g als N	B (—)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	0,00% C (±)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	0,00% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	1,03% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	1,14% M (±)		
(1,440 g) 0,1099 g als N	B (—)	N (—)		(1,560 g) 0,1239 g als N	B (—)	N (—)	
Gesamt-N = 7,63%	C (+)	S (—)		Gesamt-N = 7,94%	C (±)	S (—)	
Amino-N zum Ges.-N	7,06% M (±)			Amino-N zum Ges.-N	7,06% M (±)		
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00%			Ammoniak-N zum Ges.-N	3,08%		
2,993 g als N	B (+)	N (—)		2,493 g als N	B (+)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	14,43% C (+)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	22,81% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	17,33% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	11,43% M (±)		
(4,41 g) 0,4238 g als N				(3,50 g) 0,2884 g als N			
Gesamt-N = 9,61%	Reaktion			Gesamt-N = 8,24%	Reaktion		
Amino-N zum Ges.-N	15,16%	unklar		Amino-N zum Ges.-N	19,05%	unklar	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,95%			Ammoniak-N zum Ges.-N	2,22%		
0,1016 g als N	B (±)	N (—)		0,0476 g als N	B (+)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	16,35% C (±)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	25,42% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)		
0,1286 g als N	B (—)	N (—)		0,1134 g als N	B (±)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	45,10% C (—)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	36,00% C (—)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)		
2,166 g als N	B (±)	N (—)		1,9856 g als N	B (—)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	18,33% C (+)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	19,42% C (+)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	3,90% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	8,97% M (±)		
0,8849 g als N	B (±)	N (—)		0,5788 g als N	B (±)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	15,59% C (±)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	18,63% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)		
0,7132 g als N	B (±)	N (—)		0,7724 g als N	B (±)	N (—)	
Amino-N zum Ges.-N	32,57% C (+)	S (—)		Amino-N zum Ges.-N	40,85% C (±)	S (—)	
Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)			Ammoniak-N zum Ges.-N	0,00% M (±)		

und Gelatine (Konuma) angegeben.

Aus der Tabelle ist klar zu erschen, dass sich bei der Spaltung des Keratins eine verhältnismässig geringe Menge von Anhydriden bildete. Die Ausbeute war annähernd die gleiche wie im Falle des Gliadins. Demgegenüber trat bei der Spaltung des Seidenfibroins und der Gelatine eine beträchtliche Menge von Anhydriden auf. Über die Beziehung zwischen der Verlaufsweise der Säurespaltung von genannten Proteinen und der Menge der sich dabei bildenden Anhydride war schon oben die Rede.

V. VERTEILUNG DER AMINOSÄUREN IN DEN ABBAUFRAKTIONEN DES KERATINS.

Die Verteilung der einzelnen Aminosäuren in den Fraktionen B₂, D₁, D₂, E₁ und E₂ wurde in folgender Weise ermittelt. Je ein aliquoter Teil von diesen Fraktionen wurde mit 20 ccm 5 *n*-Schwefelsäure versetzt und 18–19 Stunden lang rückfliessend gekocht. Nach dem Erkalten wurde das Hydrolysat filtriert und in dieser Lösung der Gesamtstickstoff bestimmt. Sie wurde dann mit soviel Wasser verdünnt, dass die Konzentration der Schwefelsäure 5%ig wurde. Aus dieser Lösung wurden die Diaminosäuren mit konzentrierter Lösung von Phosphorwolframsäure ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Baryt zersetzt und in der so erhaltenen Diaminosäurefraktion die Verteilung von Cystin, Histidin, Arginin und Lysin wie folgt ermittelt. In einem aliquoten Teil dieser Lösung wurde das Cystin kolorimetrisch nach Folin und Looney (1922) unter Anwendung von Folin'schem verbessertem Harnsäurereagens(1934) bestimmt. Zur Bestimmung der übrigen Hexonbasen wurde das Verfahren von R. J. Block (1934) verwendet. Zur Ausfällung des Histidins wurde die Lösung bei pH 3–6 mit konzentrierter Silbernitratlösung und dann mit kalt-gesättigter Barytlösung versetzt, bis die Reaktion der Lösung pH 7,4 erreichte. Das Histidin scheidet sich dabei als Silbersalz aus. Es wurde abzentrifugiert und mit Wasser gewaschen. Die überstehende klare Flüssigkeit wurde dann mit heiss-gesättigter Barytlösung versetzt, bis die Reaktion der Lösung pH 13–14 erreichte, und das ausgefallene Silbersalz des Arginins

abzentrifugiert. Beide Silbersalze wurden mit Schwefelwasserstoff zerlegt und in der so erhaltenen silberfreien Lösung der Histidin- und Argininstickstoff bestimmt. In der von Histidin- und Argininsilbersalzen abzentrifugierten klaren Flüssigkeit wurde der Stickstoff bestimmt und dieser Stickstoff, vermindert um denjenigen für Cystin wurde als Lysinstickstoff angesehen. Aus dem Filtrat der Phosphorwolframsäurefällung wurde Dicarbonsäure nach dem Verfahren von D. B. Jones und O. Möller(1928) als Baryumsalz unter Zusatz von Alkohol ausgefällt. Der Niederschlag wurde durch Schwefelsäure von Baryt befreit und die Stickstoffbestimmung ausgeführt (Dicarbonsäure-N). Aus der von Dicarbonsäuren abgetrennten Restlösung schied sich beim Einengen das Tyrosin aus. In diesem Niederschlag und dem Filtrat wurde der Stickstoff bestimmt. Der Stickstoff des ersteren zeigt den des Tyrosins, während derjenige des letztern den des Monoamino-monocarbonsäure zeigt.

Die Verteilung der Aminosäuren in den Fraktionen, welche durch Spaltung mit Säure und Alkali von wechselnder Konzentration erhalten wurden, ist in Tabelle VIII und IX zusammengestellt. Aus der Aminosäureverteilung in den Abbauprodukten zeigt es sich, dass die Dicarbonsäuren nur in geringer Menge in der Anhydridfraktion auftreten, wie es schon früher von Kunishige (1937) hervorgehoben wurde. Es ist auch hier anzunehmen, dass die dicarbonsäurehaltigen Peptide wenig Neigung haben, sich bei der Säure- oder Alkalibehandlung in Diketopiperazine zu verwandeln. Von Konuma (1938) wurde festgestellt, dass in der Anhydridfraktion kein Arginin aufzufinden ist. Daraus hat er geschlossen, dass die Peptide der Diaminosäuren wenig geneigt sind, Diketopiperazine zu bilden. Beim Keratin ergab es sich dennoch, dass die Anhydridfraktion in merklichem Grade Diaminosäuren enthält. Aus der Verteilung der einzelnen Hexonbasen geht hervor, dass das Arginin nur in geringer Menge in der Anhydridfraktion aufzufinden ist, während das Lysin mehr als die Hälfte der Diaminosäuren ausmacht. Ganz entgegengesetzt verhält sich die Verteilung des Arginins und des Lysins in den Fraktionen der freien Aminosäuren und Peptide. In diesen macht das

TABELLE VIII.

Aminosäureverteilung in den Abbauprodukten des Keratins.
 10 stündige Spaltung mit 0,10, 0,15 und 0,20 *n*-Salzsäure bei 170°.

		0,10 <i>n</i>	0,15 <i>n</i>	0,20 <i>n</i>
Fraktion B ₂ In Wasser löslicher Teil des Essigäther- auszugs	Diaminosäure-N	15,33%	13,62%	16,73%
	Cystin-N	0,83%	0,80%	1,19%
	Arginin-N	3,75%	2,84%	2,31%
	Lysin-N	6,76%	6,53%	8,56%
	Histidin-N	4,72%	2,57%	3,14%
	Dicarbonsäure-N	2,19%	4,83%	5,75%
	Monoaminomono- carbonsäure-N (Tyrosin-N)	54,20% 3,15%	53,34% 4,72%	52,60% 9,46%
Fraktion D ₁ Durch Phosphorwolfram- säure fällbarer Teil der Fraktion D	Diaminosäure-N	47,12%	49,68%	51,43%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Arginin-N	48,04%	42,45%	47,42%
	Lysin-N	1,21%	4,27%	3,73%
	Histidin-N	4,09%	4,64%	3,96%
	Dicarbonsäure-N	1,48%	1,25%	0,95%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	6,15%	8,51%	11,78%
Fraktion D ₂ Durch Phosphorwolfram- säure nicht fällbarer Teil der Fraktion D	Diaminosäure-N	0,00%	0,00%	1,12%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Dicarbonsäure-N	7,76%	10,74%	9,81%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	50,67%	53,45%	55,72%
Fraktion E ₁ Durch Phosphorwolfram- säure fällbarer Teil der Fraktion E	Diaminosäure-N	64,55%	59,79%	56,00%
	Cystin-N	0,82%	0,54%	0,54%
	Arginin-N	30,94%	32,74%	32,13%
	Lysin-N	12,31%	6,47%	7,85%
	Histidin-N	4,30%	3,28%	5,29%
	Dicarbonsäure-N	9,28%	7,60%	3,71%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	13,30%	17,00%	11,50%
	(Tyrosin-N)	1,45%		
Fraktion E ₂ Durch Phosphorwolfram- säure nicht fällbarer Teil der Fraktion E	Diaminosäure-N	1,49%	0,46%	0,32%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Dicarbonsäure-N	43,10%	32,62%	27,76%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	45,06%	44,32%	33,25%
	(Tyrosin-N)	3,73%	1,24%	

TABELLE IX.

Aminosäureverteilung in den Abbauprodukten des Keratins.
10 stündige Spaltung mit 0,10, 0,20 und 0,30 *n*-Natronlauge bei 170°.

		0,10 <i>n</i>	0,20 <i>n</i>	0,30 <i>n</i>
Fraktion B ₂ In Wasser löslicher Teil des Essigäther- auszugs	Diaminosäure-N	19,55%	15,30%	18,85%
	Cystin-N	0,42%	0,25%	0,45%
	Arginin-N	2,60%	3,08%	2,22%
	Lysin-N	12,92%	7,03%	10,70%
	Histidin-N	3,42%	4,57%	3,10%
	Dicarbonsäure-N	0,99%	1,13%	4,10%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	47,60%	46,44%	50,99%
	(Tyrosin-N)	3,06%	3,07%	3,14%
Fraktion D ₁ Durch Phosphorwolfram- säure fällbarer Teil der Fraktion D	Diaminosäure-N	58,40%	29,97%	24,37%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Arginin-N	41,68%	20,41%	9,33%
	Lysin-N	2,48%	4,93%	2,79%
	Histidin-N	5,93%	4,58%	2,79%
	Dicarbonsäure-N	4,64%	5,39%	2,63%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	41,58%	41,37%	37,03%
Fraktion D ₂ Durch Phosphorwolfram- säure nicht fällbarer Teil der Fraktion D	Diaminosäure-N	7,91%	0,00%	0,00%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Dicarbonsäure-N	22,80%	6,62%	10,49%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	33,02%	25,85%	44,68%
Fraktion E ₁ Durch Phosphorwolfram- säure fällbarer Teil der Fraktion E	Diaminosäure-N	55,83%	32,43%	27,60%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Arginin-N	35,32%	16,14%	11,43%
	Lysin-N	4,36%	3,18%	4,06%
	Histidin-N	5,46%	3,54%	9,19%
	Dicarbonsäure-N	3,04%	10,16%	2,03%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	47,73%	54,53%	44,88%
Fraktion E ₂ Durch Phosphorwolfram- säure nicht fällbarer Teil der Fraktion E	Diaminosäure-N	6,33%	1,22%	1,23%
	Cystin-N	0,00%	0,00%	0,00%
	Dicarbonsäure-N	14,82%	12,23%	7,49%
	Monoaminomono- carbonsäure-N	52,97%	51,84%	64,83%

Arginin den Hauptanteil der Diaminosäuren aus, während das Lysin stark zurücktritt. Demnach ist anzunehmen, dass die Peptide des Lysins mit Leichtigkeit Diketopiperazine bilden. Obwohl das Keratin durch seinen hohen Gehalt an Cystin gekennzeichnet ist, wurde in seinen Abbauprodukten nur eine geringe Menge von Cystin aufgefunden, und zwar vorwiegend in den Anhydridfraktionen. Dies rührt daher, dass es durch Säure- und Alkalibehandlung Zersetzung erlitt. Es wurde oben dargelegt, dass die Anhydridfraktion auffallend starke Millon'sche Reaktion aufwies. Dementsprechend zeigte es sich, dass das Tyrosin in den Abbauprodukten grösstenteils in Gestalt von Anhydriden auftrat.

VI. ZUSAMMENFASSUNG UND SCHLUSS.

Die partielle Spaltung des Keratins unter wechselnden Versuchsbedingungen wurde ausgeführt, ganz ebenso wie sie in den früheren Mitteilungen von Uchino, Kunishige und Konuma dargelegt worden sind. Die Resultate meiner Untersuchungen lassen sich folgendermassen zusammenfassen:

1. Ganz im Einklang mit der früheren Mitteilungen wurde festgestellt, dass die Spaltung des Keratins durch konzentrierte Schwefelsäure nur bei Gegenwart einer gewissen Menge Wassers vor sich geht. Beim Ersetzen des Wassers durch Glycerin nimmt die Geschwindigkeit der Hydrolyse merklich ab. Ferner zeigte es sich, dass die Spaltung des Keratins im allgemeinen viel langsamer als die der anderen Proteinen erfolgte.

2. Auch die Spaltung sowohl durch verdünnte Säure als auch durch verdünntes Alkali fand erheblich langsamer als bei den übrigen Proteinen statt.

3. Das Hydrolysat des Keratins wurde in verschiedene Fraktionen getrennt und das Mengenverhältnis der beim Abbau auftretenden freien Aminosäure, Peptide und Diketopiperazine ermittelt. Die Ausbeute an Anhydriden war verhältnismässig gering und annähernd die gleiche wie im Falle des Gliadins. Dies rührt wohl daher, dass infolge starken Widerstehens des Keratins gegen chemische Eingriffe sich nur eine geringe Menge von

Peptiden bildete und dementsprechend auch geringfügige Anhydridbildung aus den letzteren erfolgte.

4. Kunishige und Konuma wiesen darauf hin, dass in den Fraktionen der Anhydride keine oder nur eine geringe Menge von Dicarbonsäuren und Arginin aufzufinden ist. Im Falle des Keratins liess sich gleichfalls eine geringe Menge von Dicarbonsäure in diesen Fraktionen nachweisen. Die Diaminosäuren wurden dennoch in ziemlich grosser Menge aufgefunden. Die Bestimmung der Aminosäureverteilung zeigte, dass auch hier wenig Arginin zugegen war, während das Lysin mehr als die Hälfte der Diaminosäuren ausmachte. Es ist demnach anzunehmen, dass die lysinhaltigen Peptide viel geneigter sind, sich in Anhydride zu verwandeln, wie die der Monoaminosäuren.

Zur Schluss bin ich Herrn Prof. Dr. T. Uchino zu herblichem Dank verpflichtet für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit.

LITERATUR.

- Block, R. J. (1934): Journ. Biol. Chem., **106**, 457.
Folin, O. (1934): Journ. Biol. Chem., **106**, 311.
Folin, O. and Looney (1922): Journ. Biol. Chem., **51**, 421.
Jones, D. B. and Moeller, O. (1928): Journ. Biol. Chem., **79**, 429.
Konuma, N. (1938): Journ. Biochem., **28**, 51.
Kunishige, T. (1937): Journ. Biochem., **25**, 307.
Uchino, T. (1934): Journ. Biochem., **20**, 65.

ÜBER DIE OXYDATION IM ORGANISMUS.

II. Mitteilung.^{*)}

Über den Einfluss verschiedener Ernährungsweisen auf die Bildung von α -Pyridinursäure.

VON

MASANARI NAGAOKA.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. N. Kageura,
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 17. April 1940.)

Es ist eine bekannte Tatsache, dass die in den Organismus eingeführte Benzoesäure durch Kuppelung mit Glykokoll in ein indifferentes Produkt, Hippursäure übergeführt wird. 1927 stellte Sendju fest, dass nach Verabreichung von α -Pikolin bzw. α -Pikolinsäure sowohl bei Hunden, Kaninchen, wie auch bei Fröschen die von Cohn gefundene Verbindung, nämlich α -Pyridinursäure, aus dem Urin erhalten wird. Nach seiner weiteren Forschung wird aber im Vogelkörper das einverleibte α -Pikolin bzw. die α -Pikolinsäure in eine mit Ornithin gepaarte Verbindung, Pyridinornithursäure übergeführt. Daraus ist leicht verständlich, dass Benzoesäure sich zu Hippursäure wie Pikolinsäure zu Pyridinursäure verhält. Dieser Vorgang, welcher aus zwei Prozessen, Oxydation und Paarung besteht und als eine Entgiftungsfunktion betrachtet werden kann, spielt für den Organismus eine bedeutende Rolle.

Kumon (1935) fand, dass sowohl bei gesunden als auch bei an B-Avitaminose erkrankten Kaninchen sich kein auffallender Unterschied in der Glykokollpaarung der verabreichten Benzoesäure, Phenylessigsäure und Phenylpropionsäure zeigt. In unserem Laboratorium stellte Hara sicher, dass beim Kaninchen, welches

^{*)} Ein Teil dieser Abhandlung wurde bereits teilweise auf der 6. Tagung der Japanischen Gesellschaft für Ernährungswissenschaft in Tokyo am 1. April 1939 öffentlich vorgetragen.

im Stoffwechsel der Hippursäure sich sehr ähnlich wie der Mensch verhält, die nach Zufuhr von Benzoesäure eintretende Ausscheidung von Hippursäure durch Hunger sowie Eiweissfettkost erheblich herabgesetzt wird. Bei solchem Sachverhalt ist es wohl von Interesse, die Beeinflussung der Entgiftungsfunktion, welche nach Verabreichung von α -Pikolin in Erscheinung tritt, durch die Ernährung zu untersuchen.

Zwei ausgewachsene männliche Hunde, welche vorher mit kohlenhydratreicher gemischter Kost gefüttert worden waren, wurden je eine Zeit lang zuerst mit Eiweissfettdiät genährt und dann dem Hunger ausgesetzt. Zwischen den letzten beiden Ernährungsperioden wurde eine Zeit lang eine Periode von gemischter Kost eingeschaltet, um irgendeinen Einfluss der vorangehenden Ernährung auf den weiteren Versuch möglichst auszuschalten. In jeder einzelnen Ernährungsperiode und zwar in der Periode von gemischter Nahrung zu jeder beliebigen Zeit, in der Eiweissfett- und Hungerperiode immer nach Ablauf einer Woche vom Beginn der betreffenden Ernährungsweise, wurde täglich 10 ccm 10%ige wässrige Lösung von α -Pikolinsäure (Firma Takeda), mit Na-Karbonat neutralisiert, fünf Tage lang durch Sonde in den nüchternen Magen eingeführt. Nach Beendigung der Belastung wurde weiter drei Tage lang wieder dieselbe Ernährung fortgesetzt, um die im Urin ausgeschiedene Ausbeute ohne Verlust zu erhalten. Dabei wurde der Harn des Tieres für die, wie oben, belasteten fünf Tage und die darauffolgenden drei Tage praktisch vollständig gesammelt, und die α -Pyridinursäure in demselben quantitativ bestimmt.

Nach einer langdauernden Periode mit gemischter Nahrung wurde mit dem α -Pikolin dieselbe Untersuchung von neuem ausgeführt. Dabei wurde täglich 1.0 g α -Pikolin, mit kleiner Menge Wasser gemischt, wieder fünf Tage lang dem Tiere zugeführt.

Die chemische Verarbeitung des Urins geschah in gleicher Weise, wie Sendju sie ausführte: der Harn wurde durch Zusatz von Essigsäure schwach sauer gemacht, bis zur Trockenheit eingedampft, mit heissem Alkohol extrahiert, der Extrakt filtriert und abgedampft, der Rückstand in 5% Schwefelsäure gelöst und mit

Phosphorwolframsäure gefällt. Der gewonnene Niederschlag wurde mit Baryt zerlegt, das überschüssige Barium durch Kohlensäure entfernt. Das Filtrat wurde dann stark eingeeengt, mit Schwefelsäure versetzt und mit Äther extrahiert. Daraus erhielt man krystallinische Niederschläge der gesuchten Substanz. Elementaranalytisch wurde mit aller Sicherheit festgestellt, dass die gereinigten Krystalle nichts anderes als α -Pyridinursäure selbst sind.

I. Versuchsreihe.

0,0527 g Substanz gaben 0,1030 g CO_2 , 0,0204 g H_2O

0,0552 g Substanz gaben 7,34 ccm N (13,0°, 760 mm)

Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_3$ Gefunden:

C 53,298% 53,33%

H 4,33% 4,44%

N 15,55% 15,57%

II. Versuchsreihe.

0,0418 g Substanz gaben 0,0820 g CO_2 , 0,0170 g H_2O

0,0625 g Substanz gaben 8 ccm N (11,0°, 766 mm)

Berechnet für $\text{C}_8\text{H}_5\text{N}_2\text{O}_3$ Gefunden:

C 53,298% 53,50%

H 4,33% 4,55%

N 15,55% 15,514%

Die Ergebnisse der in zwei Reihen angestellten Untersuchungen sind in Kürze in den folgenden Tabellen zusammengestellt.

TABELLE I.

Versuchstiere	Körpergewicht der Tiere (kg)	Verfütterte Menge der α -Pikolinsäure (g)	Gefundene Menge der α -Pyridinursäure (g)	Durchschnittswert für ein Tier	Bemerkungen
Hund A	10,3	5	2,14	2,25	Gemischte Nahrung
Hund B	11,0	5	2,35		
Hund A	9,7	5	0,91	0,76	Eiweiss-Fettdiät
Hund B	10,3	5	0,60		
Hund A	8,5	5	0,30	0,28	Hunger
Hund B	9,0	5	0,26		

TABELLE II.

Versuchstiere	Körpergewicht der Tiere (kg)	Verfütterte Menge der α Pikolin (g)	Gefundene Menge der α -Pyridinursäure (g)	Durchschnittswert für ein Tier	Bemerkungen
Hund A	13,5	5	0,64	0,58	Gemischte Nahrung
Hund B	12,0	5	0,52		
Hund A	12,0	5	0,20	0,22	Eiweissfett-diät
Hund B	10,0	5	0,24		
Hund A	11,0	5	0,11	0,10	Hunger
Hund B	8,5	5	0,08		

Wie Tabelle I. zeigt, beträgt der Mittelwert der Pyridinursäure für ein Tier 2,25 g bei gemischter Kost, 0,76 g bei Eiweissfettkost und 0,28 g beim Hunger. Daraus kann man schliessen, dass die Kuppelungsfähigkeit der α -Pikolinsäure mit Glykokoll, um α -Pyridinursäure zu bilden, durch Eiweissfett-diät sowie durch Fasten deutlich herabgesetzt wird. Aus Tabelle II. kann man ersehen, dass der Durchschnittswert der gefundenen α -Pyridinursäure für einen Hund 0,58 g bei gemischter Kost, 0,22 g bei Eiweissfett-diät und 0,10 g beim Hunger beträgt. Es unterliegt keinem Zweifel, dass die Bildung der α -Pyridinursäure aus α -Pikolin, wobei sich zwei Prozesse, vollziehen müssen, nämlich Oxydation des Pikolins zu Pikolinsäure und Paarung der letzteren mit Glykokoll, um Pyridinursäure zu bilden, durch Eiweissfett-diät sowie durch Hunger erheblich gestört wird. Bei den beiden Versuchsreihen fällt der Einfluss des Hungers regelmässig viel stärker als der der Eiweissfettkost aus.

Aus den ganzen Untersuchungsergebnissen wird wenigstens klar, dass die Fähigkeit des Organismus, die verabreichte α -Pikolinsäure mit Glykokoll zu kuppeln, durch Eiweissfettkost bzw. Hunger, welchen eine Verarmung des Kohlenhydrates gemeinsam ist, in auffallendem Grade gestört wird. Aber die Frage, in welchem Masse die Verminderung des Oxydationsvorgangs des Pikolins an der Erscheinung, welche in der Herabsetzung der Ausscheidung von Pyridinursäure in Vorscheinung tritt, beteiligt ist, bleibt noch

offen. Nach Sendju (1937) wird sowohl bei Eiweissfettkost als auch bei Hunger eine unverkennbare Verminderung der Oxydationsfähigkeit des Oxymethylfurfurols beobachtet. Weitere Durchblutungsversuche ergeben, dass der Hund in der Leber und zum kleineren Teil auch im Magen die Fähigkeit besitzt, das Oxymethylfurfurol zu Oxymethylbrenzschleimsäure zu oxydieren, aber in der Milz, Lunge und Niere ganz und gar nicht. Man bemerkt auch dabei, dass die Menge der durch Oxydation des Oxymethylfurfurols gebildeten Oxymethylbrenzschleimsäure in der Leber bei mit Eiweissfettkost genährten oder hungernden Tieren immer geringer ist, als bei normalen mit kohlenhydratreicher gemischter Kost gefütterten. Hier ist es der Ort einen lehrreichen Versuch von Ikeyama (1931) zu erwähnen: bei Kaninchen wird durch Blockierung des Retikuloendothelialsystems mit Tusche die Fähigkeit, das verabreichte α -Pikolin bzw. die α -Pikolinsäure zu entgiften, deutlich gehemmt, wobei die Beeinflussung bei α -Pikolin stärker als bei α -Pikolinsäure ausfällt.

Da nach meinem verangegangenen Durchblutungsversuche festgestellt wurde, dass der Oxydationsvorgang des α -Pikolins sich wesentlich in der Leber abspielt und sowohl nach Kageura (1922, 1923, 1924) als auch nach den zahlreichen Veröffentlichungen aus unserem Laboratorium: Yoschio (1933, 1937), Ikejiri (1933), Tsutui (1936), Matsuoka (1936), Miyasaki (1936, 1937), Ikeda (1938), Takehara (1938), Hara (1938, 1939) etc., die verschiedenen Funktionen der Leber durch Ernährung mit Eiweissfett und durch Hunger deutlich beeinflusst werden, ist es wohl zu vermuten, dass bei der Herabsetzung der Ausscheidung von α -Pyridinursäure nach Pikolinzufuhr, welche durch Eiweissfettkost sowie Fasten hervorgerufen wird, eine Störung der Oxydation des α -Pikolins irgendeine Rolle spielt. Andererseits fanden aber Sendju und Sikuma (1938) in unserem Laboratorium, welche durch Fütterungsversuche die Entgiftungsfunktion der β -Phenylpropionsäure an Hunden untersuchten, dass die Eiweissfettkost und der Hunger auf die Oxydation derselben Säure keinen merkbaren Einfluss ausüben, während sie auf die Kuppelung der durch Oxydation zustande gekommenen Benzoesäure mit dem Glykokoll,

um Hippursäure zu bilden, einen erheblichen Einfluss zeigen. Alles in allem bedarf die Beeinflussung des Oxydationsvorgangs von α -Pikolin durch die Ernährung noch weiterer Forschung. Jedenfalls ist die Tatsache, dass die Entgiftungsvorgänge im Organismus durch die Ernährung in erheblichem Masse beeinflusst werden, vom grossem Interesse.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die Fähigkeit des Organismus, nach α -Pikolin- bzw. α -Pikolinsäurezufuhr α -Pyridinsäure im Harne auszuschcheiden, wurde durch Eiweissfett-diät sowie durch Hunger deutlich herabgesetzt und zwar bei Hunger stärker als bei Eiweissfettkost.

2. Bei der genannten Störung der Entgiftungsfunktion spielt die Störung der Paarung der α -Pikolinsäure mit Glykokoll sicher eine wichtige Rolle.

Dem Verfasser ist es eine angenehme Pflicht, seinem verehrten Lehrer Herrn Prof. Dr. Kageura für seine freundliche Leitung bei dieser Arbeit seinen aufrichtigen Dank auszusprechen. Auch Herrn Prof. Dr. Sendju in unserer Klinik ist Verfasser für seine ununterbrochene Unterstützung sehr verbunden.

LITERATUR.

- Cohn, R. (1893): Z. Physiol. Chem., **18**, 112.
 Hara, T. (1938): Journ. Biochem., **27**, 157.
 Hara, T. (1939): ebenda **30**, 159.
 Ikeda, G. (1938): Journ. Biochem., **27**, 141.
 Ikejiri, K. (1933): Nippon Shokakibyogakkai Zassi, **32**, 732 u. 805.
 Ikeyama, K. (1931): Nagasaki Igakkai Zassi, **9**, 228.
 Kageura, N. (1922): Journ. Biochem., **1**, 333 u. 398.
 Kageura, N. (1923): ebenda **2**, 341.
 Kageura, N. (1924): ebenda **3**, 205 u. 457.
 Kumon, T. (1935): Journ. Biochem., **22**, 213.
 Matsuoka, Y. (1936): ebenda **23**, 161 u. **24**, 225 u. 355.
 Miyazaki, M. (1937): ebenda **26**, 1.
 Sendju, Y. (1927): ebenda **7**, 273.
 Sendju, Y. (1927): ebenda **25**, 487.
 Sendju, Y. u. Sikuma, K. (1939): ebenda **29**, 179.
 Tsutsui, T. (1936): Nagasaki Igakkai Zassi, **14**, 305.
 Yoschio, K. (1933): Journ. Biochem., **17**, 11.
 Yoschio, K. (1937): ebenda **26**, 49.

BESTIMMUNGSMETHODE DES IN KEPHALIN VERMENGTEN KOLAMINS.

VON

TOSIO YOSINAGA.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kumamoto Med. Fakultät.
Vorstand: Prof. Dr. S. Kato.)

(Eingegangen am 19. April 1940)

Aus unserer Prüfung der Bestimmungsmethode des Kolamin (Aminoäthylalkohol) durch verschiedene Alkaloidreagenzien hat es sich ergeben, dass man aus der etwa 1% Lösung von reinem Kolamin durch Zufügung von Sublimat die grösste Ausbeute (41,19%) und durch Zufügung der Pikrolonsäure die nächstgrösste (25,55%) gewinnt, und dass alle andere Reagenzien wegen der Knappheit ihrer Ausbeute zur Bestimmung ungeeignet sind. So haben wir denn Amino-N im Kolaminmolekül nach Van Slyke'scher Methode bestimmt, um die Bestimmung des Kolamins auf dem indirekten Wege anzustellen und dann geprüft, ob durch diese Weise die Bestimmung des in Kephalin vermengten Kolamins durchgeführt wird.

ISOLIERUNG UND BESTIMMUNG DES IN KEPHALIN VERMENGTEN KOLAMINS.

Man stellt Kephalin bei diesem Versuch, die Darstellungsmethode des Lecithin nach Sueyoshi (1931) modifiziert, folgenderweise her. Man fungiert das Rindhirn mit wasserhaltigem Äther, knete es nach Beseitigung des Äthers mit Aceton, beseitigt das Lösliche, löst den Rückstand in reinem Äther, nimmt den gelösten Teil auf, vertreibt den Äther, lässt mit Aceton absetzen, knetet den Niederschlag mit Aceton, bis es sich nicht mehr färbt, löst denselben in Petrol-Äther, nimmt den löslichen Teil auf, vertreibt Petrol-Äther und knetet mit Alkohol. Man wiederholt dieses Verfahren und gewinnt eine weisse, viskotische Substanz. Man wiederholt

dieses Herstellungsverfahren mit dieser Substanz noch einmal, wäscht es mit Aceton, trocknet es im Vakuumexsiccator und gewinnt endlich eine amorphe weisse fettartige Substanz, die bald in eine hellbräunliche schuppenartige Substanz übergeht. $\frac{\text{NH}_2\text{-N}}{\text{Gesamt-N}}$ der obigen Substanz lautet $\frac{95-97}{100}$.

Man stellt aus 2,0 g Kephalin mit Hilfe von Äther die Lösung dar und vertreibt den Äther unter Niederdruck durch Lüftung.

Das Kolamin wurde nach Knorr'scher Methode (1877) aus Äthylenoxyd und Ammoniakwasser dargestellt. Die Konzentration der Kolamin-Lösung wird durch die Bestimmung von Amino-N nach der Van Slyke'schen Methode festgestellt. Wir haben in diesem Experiment 2 Konzentrationsarten von Kolamin (1,0210% und 0,5303%) benutzt.

Um Kolamin in der Vermischung von Kephalin und Kolamin zu bestimmen, muss man in erster Linie Kephalin isolieren und beseitigen. Aber mit verschiedenen organischen Lösungsmitteln konnte ich Kephalin nicht vollkommen isolieren. So habe ich anstatt des organischen Lösungsmittels anorganische Salze benutzt, um Kephalin durch Aussalzung zu beseitigen. Bei Anwendung der Salze NaCl, $\text{Na}_2\text{SO}_4 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, HgCl_2 war der Niederschlag des Kephalins so unvollkommen, dass wir dadurch zu zufriedenstellenden Ergebnissen nicht kommen konnten. Aber mit Hilfe von $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$, AlCl_3 , Trichlor-essigsäure und Eisencitrat konnten wir auf leichterem Wege den Niederschlag von Kephalin gewinnen.

Der Versuch verhält sich wie das Experiment von Sakakibara u. Yosinaga (1936), wo aus der Vermischung von Lecithin und Cholin Lecithin beseitigt und aus dem Obersatz Cholin bestimmt wurde, und besteht aus zwei Stufen: 1) Absetzung des Kephalins aus der Vermischung von Kephalin und Kolamin, 2) Bestimmung des Kolamins in der Flüssigkeit, die von der Absetzung des Kephalin getrennt ist.

Man ruft aus der Vermischung von 1 ccm 1% Kephalin-Lösung und von 1 ccm Kolamin-Lösung verschiedener Konzentration mit

verschiedenem Reagenz den Niederschlag des Kephalins hervor (Verfahren 1), zentrifugiert den Niederschlag nach 5-10 Minuten ab, filtriert, wäscht den Niederschlag mit Wasser und bestimmt Kolamin aus dem Filtrat samt Waschwasser (Verfahren 2). Die Bestimmung von Kolamin wird, wie schon erwähnt, nach Van Slyke'scher Methode angestellt. Für Fällung des Kephalins wurden unten erwähnte verschiedene Fällungsmitteln gebraucht.

1. *Eisenchlorid* ($\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$).

Für Absetzung des Kephalins aus der Vermischung von 1 ccm von 1% Kephalin und von 1 ccm von 1,0210% Kolamin erwies Eisenchlorid von $\text{N} - \frac{\text{N}}{4}$ das grösste Vermögen. Nach Zentrifugierung filtriert man den Obersatz, wäscht den Niederschlag im Spitzglas mit Eisenchlorid von derselben Konzentration wie bei der Fällung, zentrifugiert, filtriert mit demselben Filter und wäscht das Filter, bis es sich vollständig entfärbt. Aus der Gesamtheit des ersten und zweiten Filtrats bestimmt man Amino-N. Das gewonnene Kolamin beträgt 99,3-100,18%.

Nach diesem Ergebnis kann man durch Eisenchlorid Kolamin aus der Vermischung von Kephalin und Kolamin mit grossem Erfolg bestimmen, aber diese Methode ist in Wirklichkeit nicht geeignet, das dieses Reagens stark sauer ist und sich zu stark färbt.

2. *Aluminiumchlorid* (AlCl_3).

Der Niederschlag des Kephalins erweist sich bei Anwendung der Konzentration von $\frac{\text{N}}{2} - \frac{\text{N}}{8}$ am stärksten getrübt und der Obersatz erweist sich nach Senkung des Niederschlags als farblos. Nach Beseitigung des Niederschlags bestimmt man Kolamin, und bei Anwendung von AlCl_3 ($\text{N} - \frac{\text{N}}{4}$) gewinnt man die grösste Ausbeute von 99,62%. Bei Absetzung des Kephalins durch AlCl_3 tritt schöne weisse Ausfällung ein, und das Sediment ist von feinsten Flocken und wirbelt daher bei der Abgiessung leicht auf, sodass man bei jeweils kaum einen und denselben Wert präzisieren kann.

3. *Aluminiumsulfat* ($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$).

Bei Anwendung der Konzentration $\frac{\text{N}}{2} - \frac{\text{N}}{8}$ ist die Absetzung des Kephalins am erfolgreichsten: die Ausbeute des Kolamins

beträgt dabei 99,75–100,90%. Aber bei der Isolierung des Kephals zeigt dieses Fällungsmittel den Nachteil wie er schon bei AlCl_3 erwähnt ist. Also ist es für den praktischen Gebrauch nicht geeignet.

4. *Trichloressigsäure* ($\text{CCl}_3\cdot\text{COOH}$).

Die Anwendung von $\text{CCl}_3\cdot\text{COOH}$ von der Konzentration von $\text{N} - \frac{\text{N}}{2}$ bringt den besten Erfolg, und die Ausbeute des Kolamins beträgt bei der Konzentration von N-Lösung 98,86% und bei der von $\frac{\text{N}}{2}$ 101,13%. Es ist dabei auf den Fehler hinzuweisen, dass erstens wegen der starken Acidität der Trichloressigsäure Kephalin der Gefahr der Zerlegung ausgesetzt ist, und dass zweitens bei Zentrifugierung direkt nach der Zufügung des Reagens die Trübung des Obersatzes andauert, wodurch die vollkommene Isolierung nicht vonstatten geht, sodass erst einnächtliches Liegenlassen den vollkommenen Niederschlag hervorruft.

5. *Eisencitrat* [$\text{Fe}_3(\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7)_2(\text{OH})_2(\text{H}_2\text{O})_2$] $\cdot 3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\cdot 18\text{H}_2\text{O}$.

Die Untersuchung wurde durch Eisencitrat-Lösung angestellt, die bei der Isolierung des Lecithins aus der vermischten Lösung von Lecithin und Cholin den besten Erfolg gebracht hat [Sakakibara u. Yosinaga (1936)].

Die Reagenzien sind von 8 verschiedenen Konzentrationen von 0,25–32%. Bei Zufügung der Reagenzien der Konzentration von 8–32% wird vollständiger Niederschlag des Kephals hervorgerufen. Dann isoliert man Kolamin aus der vermischten Lösung von Kephalin und Kolamin und bestimmt 99,29% Kolamin. Bei Untersuchung der Vermischung von 1 ccm des 1% Kephalin-Lösung und 1 ccm des 0,5303% Kolamin-Lösung beträgt die Ausbeute 98,96–99,78%. Daraus ergibt sich, dass die Bestimmung des Kolamins nach der Isolierung des Kephals mit Hilfe von Eisencitrat einen ziemlich guten Erfolg bringt. Eisencitrat ist von allen das beste Reagens bei Isolierung des Kolamins aus der vermischten Lösung von Kephalin-Kolamin, weil Kephalin sich mit Hilfe von Eisencitrat ganz stark und schnell absetzt, weil der Untersatz bei Abgiessung nicht heraufwirbelt, weil das Waschen

wegen der Färbung der Lösung vorteilhafterweise vorzuziehen geht usw. Bei den Konzentrationen von 8–32% der Eisencitrat-Lösung ist die 10% Lösung aufs vorteilhafteste brauchbar.

Schliesslich sei bemerkt, dass die erfolgreiche Isolierung des Kephals mit Hilfe von Eisencitrat und des Lecithins mit Hilfe von Eisencitrat + $\text{Fe}(\text{OH})_3$ [Sakakibara u. Yosinaga (1936)] darauf zurückzuführen ist, dass Lecithin hydrophil, aber Kephalin kaum hydrophil ist, daher leicht von Wasser trennbar ist.

SCHLUSSFOLGERUNG.

Um Kolamin aus der vermischten Lösung von Kephalin und Kolamin zu isolieren und zu bestimmen, beseitigt man Kephalin mit Hilfe von Eisencitrat, und bestimmt dann Amino-N im Obersatz nach Van Slyke'scher Methode. Man gewinnt 99,87% Kolamin.

LITERATUR.

- Knorr (1897): Ber. Deutsch. Chem. Ges., **30**, 909.
Sakakibara u. Yosinaga (1936): J. Biochem., **32**, 211.
Sueyoshi (1831): J. Biochem., **13**, 145.
Van Slyke (1912): J. Biol. Chem., **12**, 275.

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER SPEICHELAMYLASE.

II. Mitteilung: Über die Spaltung der Speichelamylase durch Proteasen und über ihren Kohlenhydrat- und Eisengehalt.

VON

HIDEO NINOMIYA.

(Aus dem Med.-Chem. Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama) und der
III. Med. Klinik (Direktor: Prof. Dr. N. Onodera) der
Kaiserl. Kyūsyū-Universität zu Hukuoka, Japan.)

(Eingegangen am 21. April 1940.)

I. SPALTUNG DER SPEICHELAMYLASE DURCH PROTEASEN.

Es gibt einige Versuche zur Feststellung der Eiweissnatur der Fermente, in denen die zerstörende Wirkung der Proteasen auf die Fermente beobachtet wurde, aber über die Speichelamylase finden sich diesbezüglich nur ganz spärliche Angaben. Nach Biedermann (1922) wird die Speichelamylase durch Pepsin erheblich, durch Trypsin aber gar nicht zerstört, und nach Tauber u. Kleiner (1934) wird die Speichelamylase durch Trypsin und Papain verdaut. Im Gegensatz dazu berichtete Katō (1928) wie folgt: Die Speichelamylase scheint durch Pepsin infolge erhöhter Azidität der Verdauungsprodukte bei unzulänglicher Pufferung zerstört zu werden, aber bei hinreichender Pufferung ist die Inaktivierung derselben keineswegs abhängig von Pepsin, und die Speichelamylase wird weder durch Trypsin noch durch Protease aus *Aspergillus oryzae* oder Heubazillenprotease inaktiviert.

Ich habe im folgenden die Wirkung von Pepsin, Trypsin sowie Papain auf die Speichelamylase untersucht. Die Speichelamylase wurde in folgender Weise bereitet: Aus filtriertem Speichel wurde die Amylase durch Halbsättigung mit gesättigtem Ammoniumsulfat ausgeschieden, nach genügender Spülung mit gesättigtem Ammoniumsulfat bei Zusatz von wenig destilliertem Wasser in Kollodiumbeuteln unter fließendem Wasser 2 Tage dialysiert, nochmals nach

Halbsättigung mit gesättigtem Ammoniumsulfat 2 Tage dialysiert und dann bei Zusatz von 0,05 Mol Natriumchlorid auf die ursprüngliche Menge des Speichels verdünnt.

Pepsin: Pepsinum pulv. solubile (E. MERCK) als 1 g/dl-Lösung.

Trypsin: Trypsinum (G. GRÜBLER) als 1 g/dl-Lösung.

Papain: Durch H₂S aktiviertes Papayotinum (E. MERCK) als 1 g/dl-Lösung.

1. Verdauung durch Pepsin.

Die Speichelamylase wurde mit der gleichen Menge $M/5$ Acetatpuffer von PH 4,4 und einem Drittel Pepsinlösung vermischt und bei Zusatz einer kleinen Menge Toluol im Wasserbad auf 40°C gehalten; es wurde in bestimmten Zeitabständen ihre amylolytische Wirkung nach Wohlgemuths Methode bestimmt. Beim Kontrollversuch wurde an Stelle des Pepsins gekochtes Pepsin verwendet. Die Resultate finden sich in Tabelle I. Die Speichelamylase wird durch Pepsin vollständig zerstört.

TABELLE I.
Verdauungsversuch der Speichelamylase durch Pepsin.

Amylase-Wert $\left(D \frac{40^\circ}{30'}\right)$

Verlauf (Std.n.)	1	5	10	24
Pepsin	24	10	0	0
gekochtes Pepsin	31	31	31	31

2. Verdauung durch Trypsin.

Die Speichelamylase wurde mit der gleichen Menge $M/15$ Phosphatpuffer von PH 8,0 und mit einem Drittel Trypsinlösung

TABELLE II.
Verdauungsversuch der Speichelamylase durch Trypsin.

Amylase-Wert $\left(D \frac{40^\circ}{30'}\right)$

Verlauf (Std.n.)	1	5	10	24
Trypsin	240	240	230	220
gekochtes Trypsin	240	240	240	240

vermischt und dann wie bei Pepsin verfahren. Die Resultate finden sich in Tabelle II. Die Speichelamylase wird durch Trypsin nur spurweise zerstört.

3. *Verdauung durch Papain.*

Die Speichelamylase wurde mit der gleichen Menge $M/10$ Citratpuffer von pH 5,0 und einem Drittel Papainlösung vermischt und weiter wie oben behandelt. Die Resultate finden sich in Tabelle III. Die Speichelamylase wird durch Papain nur spurweise zerstört.

TABELLE III.

Verdauungsversuch der Speichelamylase durch Papain.

Amylase-Wert $\left(D \frac{40^\circ}{30'}\right)$

Verlauf (Std.)	1	5	10	24
Papain	72	72	72	68
gekochtes Papain	72	72	72	72

4. *Spaltungsgrad der Speichelamylase bei Verdauungsversuchen mit Pepsin, Trypsin oder Papain.*

In Parallele zu den oben erwähnten Versuchen wurde die freigeordnete Aminosäure durch die Spaltung der Speichelamylase mit den genannten proteolytischen Fermenten mittels Foremans Methode (1920) bestimmt. Die Versuchsanordnungen waren wie folgt.

(I) 15 ccm Speichelamylase + 5 ccm Pepsin + 0,2 ccm $N/100$ HCl + eine kleine Menge Toluol.

(II) 15 ccm Speichelamylase + 5 ccm Trypsin + 0,1 ccm $N/100$ NaOH + Toluol.

(III) 15 ccm Speichelamylase + 5 ccm Papain + 0,04 ccm $N/100$ HCl + Toluol.

Obige drei Reaktionsgemische wurden einzeln im Wasserbad auf 40°C gehalten und nach 24 Stunden der Spaltungsgrad der Amylasen bestimmt. Als Kontrolle wurden die gleichen Versuche mit gekochten Proteasen angestellt. Die Resultate finden sich in Tabelle IV.

TABELLE IV.

Spaltungsgrad der Speichelamylase bei Verdauung durch Pepsin,
Trypsin od. Papain.

Verbrauchte Alkalimenge (ccm)

Einwirkungs- zeit (Std.)	Ferment					
	Pepsin	Trypsin	Papain	gekochtes Pepsin	gekochtes Trypsin	gekochtes Papain
0	0	0	0	0	0	0
24	0,33	0,02	0,01	0	0	0
Differenz des verbrauchten Alkalis	0,33	0,02	0,01	0	0	0

Der Abbau der Speichelamylase ist bei Zusatz von Pepsin erheblich, von Trypsin oder Papain jedoch sehr gering. Diese Tatsache steht ganz im Einklang mit der Inaktivierung dieses Fermentes durch die betreffenden Proteasen.

5. *Verdauung durch Kombination von Pepsin mit Trypsin
und Wirkung des Trypsins auf gekochte
Speichelamylase.*

Das Reaktionsgemisch von 15 ccm Speichelamylase, 5 ccm Pepsin, 0,2 ccm $N/100$ HCl und einer kleinen Menge Toluol wurde im Wasserbad auf 40°C gehalten und nach 10 Stunden 0,3 ccm $N/100$ NaOH und 5 ccm Trypsin zugesetzt. Nach weiteren 14 Stunden wurde die Steigerung der Azidität dieser Lösung nach Zusatz von 0,1 ccm $N/100$ HCl nach Foremans Methode bestimmt. Das Resultat findet sich in Tabelle V.

TABELLE V.

Spaltungsgrad der Speichelamylase durch Pepsin und Trypsin.

Verbrauchte Alkalimenge (ccm)

Ferment	Pepsin + Trypsin	Kontrolle
Alkalimenge	0,52	0

Die Amylasespaltung ist im Vergleich zu der bei alleiniger Pepsinverwendung erheblicher.

Nach 24stündigem Halten der gekochten Speichelamylase unter Zusatz von 5 ccm Trypsin, 0,1 ccm $N/100$ NaOH und einer kleinen Toluolmenge im Wasserbad auf 40°C wurde die Steigerung der Azidität dieser Lösung nach Zusatz von 0,1 ccm $N/100$ HCl nach Foremans Methode bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle VI.

TABELLE VI.
Spaltungsgrad der gekochten Speichelamylase durch Trypsin.
Verbrauchte Alkalimenge (ccm)

Einwirkungszeit (Std.)	Ferment	
	Trypsin	Kontrolle
0	0	0
24	0,08	0
Differenz des verbrauchten Alkalis	0,08	0

Die gekochte Amylase wird durch Trypsin mässig gespalten.

Da die natürlichen Eiweisse überhaupt durch Pepsin gut gespalten werden, aber Trypsin nur denaturierte Eiweisse gut spaltet, müssen also obige Verdauungsergebnisse der Speichelamylase, deren Natur äusserst nahe dem Globulin steht, sehr rational sein.

II. ÜBER DEN KOHLENHYDRATGEHALT DER SPEICHELAMYLASE.

Weil Speichelamylase höchstwahrscheinlich von Globulinnatur ist, und weil es auch allgemein anerkannt ist, dass Globulin im Molekül einen Zuckeranteil enthält, wurden Versuche gemacht, die zeigen sollten, wie diese Zuckerkomponente bei der oben erwähnten Proteaseeinwirkung frei wird.

Die gereinigte, mit Salzsäure ($N/2$) versetzte Speichelamylase wurde 1 Stunde gekocht und ihr Reduktionswert nach Allihns Methode gemessen. Er betrug $18,7 \text{ mg/dl}$ als Glukose.

Nach 24stündiger Einwirkung von Pepsin bzw. Trypsin oder Papain auf die Amylase wurde der Reduktionswert bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle VII.

TABELLE VII.

Durch Pepsin, Trypsin od. Papain erzeugte Zuckermenge.

Zuckermenge	Ferment					
	Pepsin	Trypsin	Papain	gekochtes Pepsin	gekochtes Trypsin	gekochtes Papain
Als Glukose (mg/dl)	11,0	0	0	0	0	0

Den Reduktionswert der durch Pepsin 10 Stunden, und weiter durch Trypsin 14 Stunden verdauten Amylase zeigt Tabelle VIII. und den der durch Trypsin 24 Stunden verdauten gekochten Amylase Tabelle IX.

TABELLE VIII.

Durch Pepsin und Trypsin verdauten Amylase erzeugte Zuckermenge.

Zuckermenge	Ferment	
	Pepsin + Trypsin	Kontrolle
Als Glukose (mg/dl)	14,0	0

TABELLE IX.

Durch Trypsin verdauten und gekochte Speichelamylase erzeugte Zuckermenge.

Zuckermenge	Ferment	
	Trypsin	Kontrolle
Als Glukose (mg/dl)	2,6	0

III. ÜBER DEN EISENGEHALT DER SPEICHELAMYLASE.

Die im Paulischen Elektrodialysierapparat 3 Tage dialysierte Speichelamylase zeigte etwas bräunlichrote Farbe. Daher wurde der Eisengehalt dieser Amylase nach Pincussens Methode (1930) bestimmt. Es zeigte sich 0,22 mg/dl Eisengehalt. Um dann zu studieren, ob Eisen ein wesentlicher Bestandteil im Fermentmolekül ist, wurde der Einfluss von Cyankali bzw. Rhodankali auf die Wirkung der Speichelamylase untersucht. Man liess verschiedene Mengen von Cyankali bzw. Rhodankali 1 Stunde einwirken und prüfte die amylytische Wirkung der Speichelamylase nach Wohlgemuths Methode (Tabelle X). Ausserdem wurden 10 cem *M*/15 Phosphatpuffer von *pH* 6,8, 1 cem 1 Stunde mit verschiedenen Mengen von Cyankali bzw. Rhodankali behandelter Speichelamylase

und Natriumchlorid (0,05 Mol) zu 25 cem 1%iger löslicher Stärkelösung zugesetzt; nach 30 Minuten wurde die Maltose nach Weins Methode bestimmt. Die Resultate finden sich in Tabelle XI.

TABELLE X.
Einfluss von Cyankali auf die Speichelamylase.

Konzentration (Mol)	0	0,1	0,01	0,001	0,0005	0,0001
Amylasewert ($D \frac{40^\circ}{30'}$)	500	unbestimmbar	320	400	460	500
Maltose (mg)	163,6	142,2	152,0	157,4	160,1	163,6

TABELLE XI.
Einfluss von Rhodankali auf die Speichelamylase.

Konzentration (Mol)	0	0,1	0,01	0,001	0,0005	0,0001
Amylasewert ($D \frac{40^\circ}{30'}$)	500	unbestimmbar	330	420	480	510
Maltose (mg)	163,6	143,1	152,9	158,3	161,8	163,6

Cyankali und Rhodankali stören die amylytische Wirkung schon in der Konzentration von 0,0005 Mol. Daher ist höchstwahrscheinlich das Eisen in der Amylase ein wesentlicher Bestandteil.

ZUSAMMENFASSUNG.

Ich habe verschiedene Experimente über das chemische Wesen der Speichelamylase ausgeführt.

Die Versuchsergebnisse sind folgende:

1. Die Speichelamylase wird durch Pepsin zerstört.
2. Die Speichelamylase wird durch Trypsin oder Pepsin fast nicht zerstört.
3. Die Speichelamylase enthält Kohlenhydrat.
4. Die Speichelamylase enthält Eisen.
5. Die Speichelamylase wird durch Cyankali und Rhodankali gehemmt.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Kodama und Herrn Prof. Dr. N. Onodera von der Kaiserlichen Universität zu Hukuoka für die Anregung zu dieser Arbeit und seine Leitung meinen besten Dank sagen.

LITERATUR.

Biedermann (1922): Biochem. Zeitschr., **127**.

Katō, M.: Eiyōkenkyūsyō Hōkoku, **2**.

Tauber u. Kleiner (1934): Journ. Biol. Chem., **105**.

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER SPEICHELAMYLASE.

III. Mitteilung: Über die Wirkung der Speichelamylase auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von Speichel- und Pankreasamylase auf Amylopektin und Amylose.

VON

HIDEO NINOMIYA.

(Aus dem Med.-chem. Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama) und der
III. Med. Klinik (Direktor: Prof. Dr. N. Onodera) der
Kaiserl. Kyūsyū-Universität zu Hukuoka, Japan.)

(Eingegangen am 21. April 1940.)

I. ÜBER DIE WIRKUNG DER SPEICHELAMYLASE AUF DIE VERSCHIEDENEN STÄRKEARTEN.

Ich habe die Wirkung der Speichelamylase auf 29 Stärkearten nach der E. A. Symsschen Kolorimetrie und Zuckerbestimmung erforscht.

Die Speichelamylase wirkte auf die Stärke ein; die Zeit bis zum achromatischen Punkt wurde mit E. A. Syms Apparat bestimmt. Dann liess man auf die betreffende Stärke die Speichelamylase einwirken und mass die, in der bestimmten Zeitdauer produzierte Maltose nach Willstätter u. Schudel.

Die Speichelamylase wurde nach der oben beschriebenen Weise hergestellt. Die Stärken wurden quantitativ dadurch bestimmt, dass sie mit Salzsäure gespalten wurden, und die Menge der hier produzierten Glukose mit 0,9 multipliziert wurde (Tabelle I).

0,5 g (absoluter Wert) der betreffenden Stärke (z.B. Kartoffelstärke $0,5 \times \frac{100}{84,68} = 0,59$) wurde in der Reibschale stark gerieben und mit wenig Wasser kleistrig gemacht und unter starkem Rühren zu 300 ccm siedendem Wasser zugegossen und nach 3 Minuten langem Kochen abgekühlt und auf 500 ccm mit Wasser aufgefüllt.

TABELLE I.
Analysenresultate von 29 Stärkearten.

Art	Kartoffel	Batate	Yamswurzel	Lilie	Hundszahn	Pfeilwurzel	Pfeilkraut	Ingwer	Wurzel der Lotuspflanze	Flügelfarn
Stärke- menge (%)	84,68	83,21	80,84	82,83	84,38	85,64	83,22	81,19	82,06	80,55

Art	Weizen	Reis	Gerste	Nacktfrüchtige Gerste	Hafer	Buchweizen	Mais	Kolbenhirse	Hirse	Mungobohne
Stärke- menge (%)	84,11	85,18	82,21	83,17	80,99	81,00	82,10	80,25	80,46	82,13

Art	Erbse	Schminkbohne	Schwertbohne	Saubohne	Erduß	Ginkgobaum	Kastanie	Sagobaum	Banane
Stärke- menge (%)	81,74	81,55	80,37	83,88	79,84	81,26	83,33	82,04	81,44

Das Reaktionsgemisch war wie folgt: 0,1 g/dl Stärkelösung 80 ccm, *M*/15 Phosphatpuffer von pH 6,8 40 ccm, 100fach verdünnte Speichelamylase 40 ccm und Natriumchlorid 0,05 Mol. Die Versuchsergebnisse finden sich in Tabelle II.

Der Versuch, mit dem Reaktionsgemisch von 0,1 g/dl Stärkelösung 80 ccm, *M*/5 Acetat-Puffer von pH 4,8 40 ccm von 0,01 g/dl Takadiastaselösung 40 ccm ausgeführt, ergab die Werte in Tabelle III.

Die Wirkung der Speichelamylase und der Takadiastase auf die verschiedenen Stärkearten ist fast gleich. Die Amylase ist bei

TABELLE II.

Wirkung der Speichelamylase auf verschiedene Stärken.

Stärke	Zimmer- temperatur (°C)	Zeit*	Maltose (mg)
Kartoffel	16,8	3' 3"	22,84
Batate	"	3' 7"	21,96
Yamswurzel	"	4' 38"	25,72
Lilie	"	3' 10"	24,86
Hundszahn	"	3' 8"	21,65
Pfeilwurzel	"	2' 34"	27,05
Pfeilkraut	"	3' 8"	20,32
Ingwer	"	3' 9"	20,21
Wurzel der Lotuspflanze	"	3' 11"	24,86
Flügelfarn	"	3' 6"	21,44
Weizen	16,6	9' 7"	20,58
Reis	"	8' 59"	20,45
Gerste	"	9' 21"	20,23
Nacktfrüchtige Gerste	"	9' 13"	19,86
Hafer	"	8' 22"	20,28
Buchweizen	17,0	8' 24"	20,34
Mais	"	9' 43"	19,47
Kolbenhirse	"	8' 47"	19,95
Hirse	"	9' 22"	20,01
Mungobohne	16,6	3' 1"	24,01
Erbse	"	3' 4"	23,26
Schminkbohne	"	3' 3"	23,00
Schwertbohne	"	3' 3"	22,89
Saubohne	"	3' 1"	24,45
Erdnuss	16,9	3' 45"	18,06
Gingkobaum	"	3' 16"	25,72
Kastanie	"	2' 51"	20,58
Sagobaum	"	3' 10"	21,89
Banane	"	3' 11"	22,46

* Zeit bis zum achromatischen Punkt.

Wurzelgewächsen, Hülsenfrüchten und Obst am schnellsten und bei Getreide am langsamsten.

TABELLE III.
Wirkung der Takadiastase auf verschiedene Stärken.

Stärke	Zimmer- temperatur (°C)	Zeit*	Maltose (mg)
Kartoffel	19,5	3'10"	23,17
Batate	"	3'14"	22,34
Yamswurzel	"	4'54"	25,93
Lilie	"	3'11"	24,95
Hundszahn	18,8	3'10"	22,80
Pfeilwurzel	"	2'58"	27,24
Pfeilkraut	"	3'14"	20,58
Ingwer	"	3'15"	20,44
Wurzel der Lotuspflanze	"	3'18"	25,06
Flügelfarn	"	3'15"	21,67
Weizen	19,8	9'21"	20,84
Reis	"	9'12"	20,72
Gerste	"	9'31"	20,51
Nacktfrüchtige Gerste	"	9'21"	20,10
Hafer	"	9' 8"	20,63
Buchweizen	20,2	9' 1"	20,69
Mais	"	10'22"	19,75
Kolbenhirse	"	9'29"	20,02
Hirse	"	10' 3"	20,22
Mungobohne	20,1	3' 6"	24,24
Erbse	"	3'10"	23,45
Schminkebohne	"	3' 9"	23,21
Schwertbohne	"	3'11"	23,17
Saubohne	"	3' 4"	24,66
Erdnuss	20,2	3'48"	18,16
Gingkobaum	"	3'21"	25,96
Kastanie	"	3' 1"	20,66
Sagobaum	"	3'14"	22,05
Banane	"	3'17"	22,74

II. ÜBER DIE WIRKUNGSUNTERSCHIEDE VON SPEICHEL- UND PANKREASAMYLASE AUF AMYLOPEKTIN UND AMYLOSE.

Stärke besteht aus Amylopektin und Amylose, wovon das

erstere die Hülle und die letztere die innere Schicht der Stärke bildet. Es wäre mir äusserst interessant zu erfahren, ob nicht vielleicht das Amylopektin der genossenen Stärke zuerst durch die Speichelamylase, und dann die Amylose durch die Pankreasamylase verdaut wird.

Die Speichelamylase wurde als 500fache Lösung und die Pankreasamylase, von Schweinepankreas nach Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Hesse bereitet, als 0,01 g/dl-Lösung verwandt.

Amylopektin und Amylose wurden aus der Kartoffel- und Mungobohnenstärke hergestellt. Das Amylopektin wurde nach Gatin-Grusewska aus Kartoffelstärke zu 42,2% und aus Mungobohnenstärke zu 42,9% gewonnen. Aus dem bei der Amylopektinbereitung überstehenden Wasser wurde die Amylose mit grossen Mengen Alkohols ausgeschieden und wiederholt mit Alkohol und Äther gespült. Somit wurde sie aus Kartoffelstärke zu 21,2% und aus Mungobohnenstärke zu 20,8% gewonnen.

Auf das Amylopektin bzw. die Amylose liess ich die Speichel- bzw. Pankreasamylase einwirken und mass die Zeit bis zum achromatischen Punkt nach E. A. Sym und die produzierte Maltose nach Willstätter u. Schudel.

Das Reaktionsgemisch war wie folgt: 0,1 g/dl Amylopektin- (bzw. 0,1 g/dl Amylose-) Lösung 80 ccm, M/15 Phosphatpuffer von PH 6,8 40 ccm, Speichel- (bzw. Pankreas-) Amylase 40 ccm und Natriumchlorid 0,05 Mol.

Die Resultate finden sich in Tabelle IV, V, VI und VII. Die

TABELLE IV.
Wirkung der Speichelamylase auf
Kartoffelstärke.

Stärke	Zimmer- tempera- tur (°C)	Zeit*	Maltose (mg)
Amylo- pektin	22,4	5'36"	15,83
Amylose	"	6' 9"	23,15

TABELLE V.
Wirkung der Pankreasamylase auf
Kartoffelstärke.

Stärke	Zimmer- tempera- tur (°C)	Zeit*	Maltose (mg)
Amylo- pektin	22,4	6' 3"	16,37
Amylose	"	5'17"	28,41

* Zeit bis zum achromatischen Punkt.

TABELLE VI.

Wirkung der Speichelamylase auf
Mungobohnenstärke.

Stärke	Zimmer- tempera- tur (°C)	Zeit*	Maltose (mg)
Amylo- pektin	22,3	5'33"	15,96
Amylose	"	6' 7"	23,32

TABELLE VII.

Wirkung der Pankreasamylase auf
Mungobohnenstärke.

Stärke	Zimmer- tempera- tur (°C)	Zeit*	Maltose (mg)
Amylo- pektin	22,3	5'58"	16,52
Amylose	"	5'13"	28,66

Speichelamylase wirkt auf das Amylopektin gut und die Pankreasamylase auf die Amylose gut.

ZUSAMMENFASSUNG.

Es gibt eine ausgiebige Literatur über die Wirkung der Speichelamylase, aber Beobachtungen über die Amylasewirkung auf verschiedene Stärken, und zwar mit der Bestimmung des produzierten Zuckers, sind selten. Im allgemeinen untersuchte man zumeist die Amylyolyse nur einer bestimmten Stärke und mass sie mit der einfachen Jodreaktion.

Ich habe die Wirkung der Speichelamylase auf 29 Stärkearten nach E. A. Syms Kolorimetrie und Zuckerbestimmung erforscht. Auch habe ich die Wirkungsunterschiede von Speichel- und Pankreasamylase auf das Amylopektin und die Amylose verfolgt.

Die Versuchsergebnisse sind folgende:

1. Die Wirkung der Speichelamylase ist bei den Wurzelgewächsen, Hülsenfrüchten und Obst am stärksten und bei den Getreidearten am schwächsten.

2. Die Speichelamylase wirkt gut auf das Amylopektin und die Pankreasamylase gut auf die Amylose.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Kodama und Herrn Prof. Dr. N. Onodera von der Kaiserlichen Universität zu Hukuoka für die Anregung zu dieser Arbeit und ihre Leitung meinen besten Dank sagen.

LITERATUR.

Sym, E. A. (1932): Biochem. Zeitschr., **251**.

Gatin-Grusewska: Zitiert nach Géza Zemplén: Abderhaldens Handb.
d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. I., T. 5.

Willstätter, Waldschmidt-Leitz u. Hesse (1923) Zeitschr. f.
physiol. Chem., **125, 126**; (1925): **142**.

BEITRAG ZUR KENNTNIS DER SPEICHELAMYLASE.

IV. Mitteilung: Über die Immunisierung mit Speichelamylase.

VON

HIDEO NINOMIYA.

*(Aus dem Med.-Chem. Institut (Direktor: Prof. Dr. K. Kodama) und der
III. Med. Klinik (Direktor: Prof. Dr. N. Onodera) der
Kaiserl. Kyūsyū-Universität zu Hukuoka, Japan.)*

(Eingegangen am 21. April 1940.)

Da bisher noch nie über ein Antiferment für animale Amylase berichtet worden ist, habe ich über die Produktion des Antifermentes der Speichelamylase geforscht.

I. PRÄZIPITATION DER SPEICHELAMYLASE DURCH SERUM VON KANINCHEN, DIE MIT SPEICHELAMYLASE IMMUNISIERT WORDEN WAREN.

Die Speichelamylase wurde nach der oben beschriebenen Weise hergestellt. Es wurden gesunde reife Kaninchen verwendet. Nach Ausschluss der Tiere, deren Serum vor der Immunisierung die Speichelamylase schon präzipitierte, wurden 2 ccm Speichelamylase mit 4tägigen Intervallen 5mal in die Ohrvene injiziert. Am 10. Tage nach der letzten Injektion wurde das Blut der immunisierten Kaninchen aus der Jugularvene entnommen und das Blutserum gewonnen. Die Präzipitation wurde mit der Schichtprobe bei Zimmertemperatur untersucht. Als Reaktionsantigen wurde eine bestimmte Verdünnungsreihe der betreffenden Speichelamylase verwendet. Die Resultate finden sich in Tabelle I.

Mit Speichelamylase immunisiertes Kaninchenserum zeigt mässige Präzipitation gegen Speichelamylase.

TABELLE I.

Präzipitation der Speichelamylase durch Serum von Kaninchen, die mit Speichelamylase immunisiert worden waren.

Kaninchen-Nr.	Verdünnungsgrad der Speichelamylase									
	5	10	20	25	40	50	80	100	160	200
I	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	—
II	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	±

II. WIRKUNG DES MIT SPEICHELAMYLASE IMMUNISIERTEN KANINCHENSERUMS AUF DIE SPEICHELAMYLASE.

Die Speichelamylase wurde mit der gleichen Menge des mit der betreffenden Amylase immunisierten Kaninchenserums vermischt und nach 1 Stunde filtriert; ihre amylytische Wirkung wurde nach Wohlgemuth bestimmt. Beim Kontrollversuch wurde das gleiche Verfahren mit nicht immunisiertem Kaninchenserum angestellt. Die Resultate finden sich in Tabelle II.

TABELLE II.

Wirkung des mit Speichelamylase immunisierten Kaninchenserums auf die Speichelamylase.

Amylase-Wert $D \frac{40^\circ}{30'}$

Kaninchen-Nr.	Ferment		
	Speichelamylase + Immunserum	Speichelamylase + Kontrastserum	Speichelamylase
I	190	320	250
II	170	320	250

Die Speichelamylase wird durch Serum von Kaninchen, die mit der betreffenden Amylase immunisiert worden waren, gestört.

III. PRÄZIPITATION DER SPEICHELAMYLASE DURCH SERUM VON KANINCHEN, DIE MIT GEKOCHTER SPEICHELAMYLASE IMMUNISIERT WORDEN WAREN.

2 ccm gekochte Speichelamylase wurden 5 mal in 4tägigen

Intervallen in die Ohrvene der Kaninchen injiziert und am 10. Tage nach der letzten Injektion das Blut entnommen und das Serum gewonnen.

Die Präzipitation dieses Serums gegen die Speichelamylase ist relativ schwach (Tabelle III), indessen die gegen gekochte Speichelamylase stärker (Tabelle IV).

TABELLE III.

Präzipitation der Speichelamylase durch Serum von Kaninchen, die mit gekochter Speichelamylase immunisiert worden waren.

Kaninchen-Nr.	Verdünnungsgrad der Speichelamylase				
	5	10	20	25	40
III	++	++	+	±	—
IV	++	+	—	—	—

TABELLE IV.

Präzipitation der gekochten Speichelamylase durch Serum von Kaninchen, die mit gekochter Speichelamylase immunisiert worden waren.

Kaninchen-Nr.	Verdünnungsgrad der gekochten Speichelamylase									
	5	10	20	25	40	50	80	100	160	200
III	++	++	++	++	++	++	++	+	—	—
IV	++	++	++	++	++	+	±	—	—	—

IV. WIRKUNG DES MIT GEKOCHTER SPEICHELAMYLASE IMMUNISIERTEN KANINCHENSERUMS AUF DIE SPEICHELAMYLASE.

Die Speichelamylase wurde mit der gleichen Menge von Kaninchenserum, das mit gekochter Speichelamylase immunisiert worden war, vermischt, und nach einstündigem Stehenlassen ihre amylytische Wirkung bestimmt. Als Kontrolle wurde der gleiche Versuch mit nicht immunisierten Kaninchen angestellt. Die Resultate finden sich in Tabelle V.

Die Speichelamylase wird durch Serum von Kaninchen, die mit

TABELLE V.

Wirkung des mit gekochter Speichelamylase immunisierten Kaninchenserums auf die Speichelamylase.

Amylase-Wert $D \frac{40^\circ}{30'}$

Kaninchen- Nr.	Ferment		
	Speichelamylase + Immunserum	Speichelamylase + Kontrastserum	Speichelamylase
III	230	280	250
IV	250	280	250

gekochter Speichelamylase immunisiert worden waren, nur wenig gestört.

V. ÜBER DAS ARTHUSSCHE PHÄNOMEN BEI MIT SPEICHEL-AMYLASE IMMUNISIERTEN KANINCHEN.

Da in den vorigen Untersuchungen die Kaninchen mit Speichelamylase immunisiert werden konnten, so muss bei diesen Tieren das Arthussche Phänomen voraussichtlich erkannt werden. Um das festzustellen, wurden folgender Versuch durchgeführt.

Die mit Speichelamylase immunisierten Kaninchen I und II wurden an der Bauchdecke rasiert und am 15. Tage nach der letzten Injektion dort 0,5 ccm Speichelamylase intrakutan injiziert. Als Kontrolle wurde das gleiche Verfahren an nicht immunisierten Kaninchen ausgeführt. Nach 24 Stunden zeigten die immunisierten Kaninchen lokal eine deutliche Anschwellung und hämorrhagische Infiltration, die bei nicht immunisierten Kaninchen fast fehlten.

Die Versuchsergebnisse sind folgende:

1. Das mit Speichelamylase immunisierte Kaninchenserum zeigt mässige Präzipitation gegen Speichelamylase.
2. Die Speichelamylase wird durch Serum von Kaninchen, die mit der betreffenden Amylase immunisiert worden waren, gestört.
3. Die Präzipitation des Serums von Kaninchen, die mit gekochter Speichelamylase immunisiert worden waren, ist gegen

Speichelamylase relativ schwach, jedoch die gegen gekochte Speichelamylase stärker.

4. Die Speichelamylase wird durch Serum von Kaninchen, die mit gekochter Speichelamylase immunisiert worden waren, nur wenig gestört.

5. Die mit Speichelamylase immunisierten Kaninchen zeigen deutlich das Arthussche Phänomen.

Zum Schluss möchte ich Herrn Prof. Dr. K. Kodama und Herrn Prof. Dr. N. Onodera von der Kaiserlichen Universität zu Hukuoka für die Anregung zu dieser Arbeit und ihre Leitung meinen besten Dank sagen.

ÜBER DEN EINFLUSS DER FETTDIÄT AUF DIE PARESE ALS FOLGE VON DIPHTherIETOXIN.

VON

SHUNKITI TAMURA.

(Aus dem klini.-chem. Laboratorium der Keio-Universität, Tokyo.
Vorstand: Prof. Y. Sueyoshi.)

(Eingegangen am 23. April 1940.)

I. EINLEITUNG.

Wie Sugiyama's Versuch (1937) zeigt, könnte eininniger Zusammenhang zwischen den Funktionen und dem Fettgehalt des Nerven bestehen. Auch beim Toda'schen Versuch (1940) wurde nachgewiesen, dass wenn den Tauben Fettdiät gegeben wurde, sie eine verstärkte Schutzkraft gegenüber den verschiedenen Nervengiften zeigen.

Ich untersuchte nun, welchen Einfluss die Fettdiät auf die Parese als Folge von Diphtherietoxin hat.

II. MATERIAL UND UNTERSUCHUNGSMETHODE.

A. Als Versuchstiere dienten Kücken, die für 10 Tage aufgezogen und denen am 11. Versuchstage das Diphtherietoxin injiziert wurde.

Die Basaldiät setzte sich zusammen aus

Mehl von poliertem Reis	70%
entfettetem Kasein	25%
Salz (McCollum)	5%
Oryzanin (Vitamin B)	1,4%
unverseifbare Substanz des Lebertrans	0,04%

Es wurden täglich 5 g dieser Diät an die Kücken verfüttert.

Zuweilen trat bei künstlicher Fütterung eine beinlähmende Krankheit auf. Die Ursache dieser Krankheit ist noch unklar, vielleicht hängt sie von den Lebensbedingungen der Kücken (Umgebung des Stalles, Sand und Sonnenlicht) ab.

Ich versuchte dieser Krankheit vorzubeugen, indem ich meine Kückenzeit im geeigneten Raume bei elektrischer Wärme hielt, und auf den mit sauberen Sand bestreuten Spielplatz das volle Sonnenlicht einwirken liess. Unter diesen Bedingungen fand eine normale Entwicklung der Kücken statt.

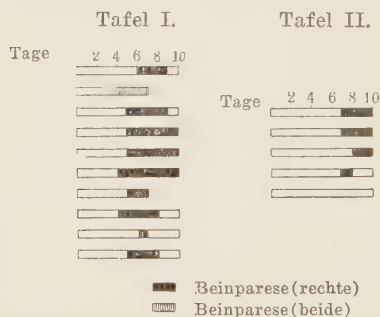
B. Diphtherietoxin.

Ich verwendete das Diphtherietoxin vom Kaiserlichen Untersuchungsinstitut für Infektionskrankheiten. Die Einverleibung desselben wurde in die rechte Brust vorgenommen. Die minimale Letaldosis (m.l.D.) war die gleiche wie die für Meerschweinchen.

III. ERGEBNISSE DER UNTERSUCHUNG.

Versuch I.

Bei den mit vorerwähnter Diät gefütterten 10 Kücken führte die Injektion von Diphtherietoxin, $1/30$ m.l.D., ausnahmslos zur Beinlähmung. Das Ergebnis zeigt Tafel I.



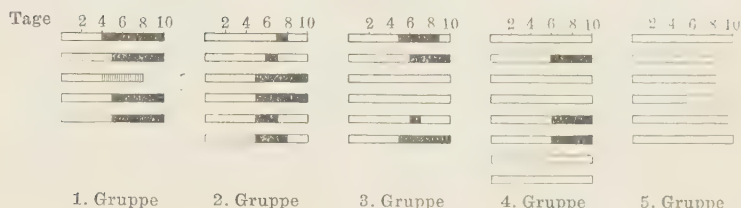
Die Verminderung der Injektionsdosis von $1/30$ bis $1/35$ m.l.D. rief bei 1 von 5 Kücken keine Parese hervor. (Tafel II).

Es wurde somit festgestellt, dass die $1/30$ m.l.D. Toxindosis für meinen Versuch geeignet war.

Versuch II.

Das es sich gezeigt hat, dass die Beinparese bei $1/30$ m.l.D. bei allen Fällen zu erzeugen war, untersuchte ich, wieweit die Fütterung des Olivenöls eine Wirkung auf das Auftreten der Beinparese hat. Die Kücken wurden mit vorhergehender Diät zusätzlich des Olivenöls gefüttert. Sie wurden in 5 Gruppen eingeteilt. Dem Futter der ersten Gruppe wurden 2%, dem der zweiten 5%, dem der dritten 7%, dem der vierten 10% und dem

Tafel III.



der fünften 15% Olivenöl zugesetzt. Das Ergebniss zeigt Tafel III.

Wie die Tafel III zeigt, kam es bei 5 Kücken der 1. Gruppe (2% Olivenöl) und 6 Kücken der 2. Gruppe (5%) ausnahmslos zur Beinlähmung, während sie bei 6 Kücken der 3. Gruppe (7%) bei 4 und bei 8 Kücken der 4. Gruppe (10%) bei 3 zutage trat. Bei 6 Kücken der 5. Gruppe (15%) konnte diese Erscheinung nicht konstatiert werden.

Durch diesen Versuch wurde nachgewiesen, dass die Fütterung mit einer bestimmten Menge Olivenöl gegen die Lähmung infolge der Injektion von Diphtherietoxin zu schützen vermag.

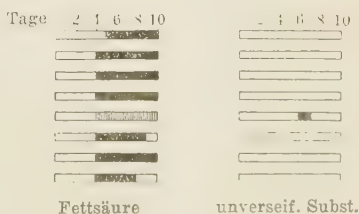
Versuch III.

Bei Versuch II hat es sich erwiesen, dass die Fütterung mit Olivenöl die Schutzkraft gegen die Lähmung durch Diphtherietoxin verstärkt. Ich untersuchte nun, welcher Bestandteil des Olivenöls diese Wirkung hervorruft.

Das Olivenöl wurde zunächst im wärmen Alkohol gelöst, und mit Natronlauge verseift, dann der Alkohol abgedampft. Danach wurde die Fettsäure und die unverseifbare Substanz nach der Kumagawa-Suto'schen Fettbestimmungsmethode getrennt.

Das verwendete Olivenöl enthielt 95,3%ige Fettsäure und 0,76%ige unverseifbare Substanz. Ich fügte die Fettsäure sowie unverseifbare Substanz je entsprechend dem 15%igen Olivenöl, d. h. 14,3%ige Fettsäure sowie 0,12%ige unverseifbare Substanz

Tafel IV.



zur künstlichen Diät hinzu und macht den neuen Versuch ebenso wie den vorigen. Das Resultat zeigt Tafel IV.

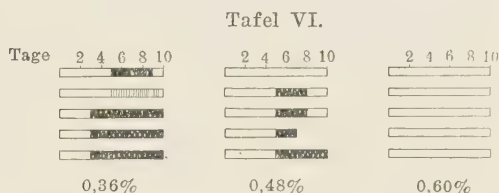
Wie aus der Tafel IV ersichtlich ist, wurden die Beine der 8 Kücken in Gruppe 1, die mit Fettsäure gefüttert waren, ausnahmslos gelähmt, während bei den 8 Kücken der Gruppe 2 die mit unverseifbarer Substanz aufgezogen waren, nur in einem Falle die Lähmung zur Beobachtung kam. Nach diesem Versuch kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die unverseifbare Substanz des Olivenöls die Schutzkraft gegen die Parese durch Diphtherietoxin enthält.

Versuch IV.

Versuch III hat gezeigt, dass man die Kücken gegen Parese als Folge von Diphtherietoxin durch die unverseifbare Substanz des Olivenöls schützen kann. Ich untersuchte nun, ob die zunehmende Menge dieser Substanz auch die Schutzkraft gegenüber dem verstärkten Toxin besitzt oder nicht. Aus vorigem Versuch ergab sich die Tatsache, dass 0,12% unverseifbarer Substanz im Futter gegen die Parese durch 1/30 m.l.D. Toxin schützen kann. Ich setzte nämlich erstens 0,12%, zweitens 0,24% und drittens 0,36% unverseifbare Substanz zur Diät hinzu, und prüfte welchen Einfluss dies auf die Parese durch 1/25 m.l.D. Diphtherietoxin hat. Das Resultat zeigt die Tafel V.

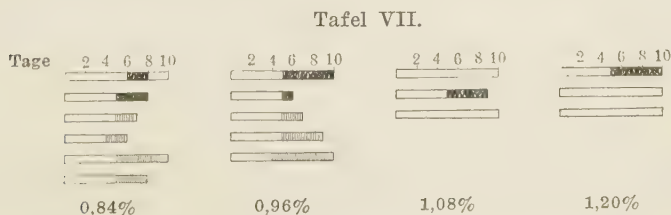


aufgezogen waren, nicht zur Beinlähmung. Aus dem obigen Versuch geht hervor, dass die 0,36% unverseifbare Substanz des Olivenöls gegen die Parese durch 1/25 m.l.D. Diphtherietoxin zu schützen vermag. Sodann erhöhte ich das Diphtherietoxin bis auf 1/20 m.l.D. um die Schutzkraft der unverseifbaren Substanz des Olivenöls zu prüfen. Die erste Gruppe wurde mit 0,36%, die zweite Gruppe mit 0,48% und die dritte Gruppe mit 0,60% unverseifbarer Substanz aufgezogen. Das Resultat zeigt Tafel VI.



Wie Tafel VI zeigt, kam die Parese durch 1/20 m.l.D. Diphtherietoxin bei 5 Küken, die mit 0,36% unverseifbarer Substanz, ausnahmslos, und bei 4 von 5 Küken, die mit 0,48% gleicher Substanz gefüttert waren, zustande. Während 5 Küken, die mit 0,60% unverseifbarer Substanz ernährt waren, ganz gesund blieben. Daraus ergibt sich, dass die Küken gegen Parese als Folge von 1/20 m.l.D. Diphtherietoxin durch 0,60% unverseifbare Substanz geschützt werden können.

Dann erhöhte ich die Toxindosis bis auf 1/15 m.l.D. und untersuchte die Schutzkraft der unverseifbaren Substanz. Die erste Gruppe wurde mit 0,84%, die zweite mit 0,96%, die dritte mit 1,08% und die vierte mit 1,20% unverseifbarer Substanz gefüttert. Die Ergebnis zeigt Tafel VII.



Aus der Tafel VII erkennt man, dass die Lähmung durch

Toxin bei 6 Kücken, die mit 0,84%, und bei 5 Kücken, die mit 0,96% unverseifbarer Substanz gefüttert waren, ohne Ausnahme hervorgerufen wurde. Während bei Fütterung mit 1,08% unverseifbarer Substanz bei 1 von 3 Kücken, und bei der mit 1,20% bei 1 von 3 Kücken die Lähmung erfolgte.

Es kann somit gesagt werden, dass die Kücken gegen die Parese als Folge von 1/15 m.l.D. Diphtherietoxin mit über 1,08% unverseifbarer Substanz geschützt wurden. Aber bei grosser Zufuhr der unverseifbaren Substanz neigen die Kücken zur Körperschwäche und gehen manchmal während der Beobachtung zugrunde. Ich habe deshalb unterlassen, den Kücken weitere erhöhte Mengen von unverseifbarer Substanz darzureichen.

Versuch V.

Bei vorliegendem Versuch hat sich gezeigt, dass man die Kücken gegen die Parese als Folge von Diphtherietoxin durch Fütterung mit unverseifbarer Substanz des Olivenöls schützen kann, und dass bei grosser Zufuhr dieser Substanz die Kücken zur Körperschwäche neigen.

Tafel VIII.
Tage 2 4 6 8 10



Um gegen die Parese als Folge von 1/25 m.l.D. Diphtherietoxin durch geringste Zufuhr der unverseifbaren Substanz zu schützen, wurde die vorher oral verfütterte Menge (0,24%) von unverseifbarer Substanz jetzt in 0,05 ccm Olivenöl subkutan eingespritzt. Das Ergebnis zeigt Tafel VIII.

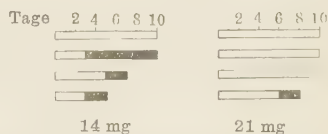
Aus dem Versuch IV ergab sich die Tatsache, dass bei 6 von 8 Kücken, denen 1/25 m.l.D. Diphtherietoxin verabfolgt und die mit 0,24% der Diät zugesetzter unverseifbarer Substanz gefüttert waren, die Beinlähmung auftrat. Wie der Versuch V es erkennen lässt, blieb durch die Injektion der entsprechenden Menge unverseifbarer Substanz die Beinlähmung als Folge von Diphtherietoxin aus. Es kann somit gesagt werden, dass die Schutzkraft bei der Zufuhr durch Injektion grösser als per os ist.

Alsdann erhöhte ich die Dose des Diphtherietoxins bis auf 1/20 m.l.D. und bemerkte dabei die Beinlähmung bei 3 von 4

Küicken, welchen 14 mg, und bei 1 von 4 Küicken, welchen 21 mg der unverseifbaren Substanz täglich eingespritzt worden war. Beim letzten Fall war die Menge der unverseifbaren Substanz bei der Injektion fast gleich wie die bei peroralen Zufuhr, die mit 0,48% der Diät zugesetzter unverseifbarer Substanz verabreicht wurde.

Aus dieser Tatsache, dass bei 3 von 4 Küicken, die mit 0,48% unverseifbarer Substanz gefüttert waren, die Beinlähmung durch 1/20 m.l.D. Diphtherietoxin hervorgerufen wurde, erkennt man, wie Tafel IX es zeigt, dass die Schutzkraft der unverseifbaren Substanz gegen die Parese durch Diphtherietoxin bei der Injektion grösser als bei oraler Darreichung ist.

Tafel IX.



Wenn jedoch die Menge der unverseifbaren Substanz bis auf 35 mg erhöht wird, dann ist bei den

Küicken eine Neigung zur Körperschwäche zu beobachten, ähnlich wie bei oraler grosser Zufuhr dieser Substanz.

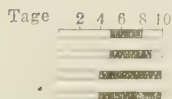
Aus obigem Versuch geht hervor, dass die unverseifbare Substanz bei Injektion eine grössere Schutzkraft gegen die Parese als Folge von Diphtherietoxin hat, als bei oraler Darreichung, jedoch war die Körperschwäche der Küicken bei Zufuhr durch die Einspritzung häufiger wie bei oraler, deshalb erwies sich die Zufuhr durch Injektion für meine Zwecke nicht als die geeignete Methodik.

Versuch VI.

Durch obigen Versuch wurde nachgewiesen, dass die unverseifbare Substanz des Olivenöls gegen die Beinlähmung der Küicken durch Diphtherietoxin zu schützen vermag.

Ich untersuchte nun, welcher Bestandteil in der unverseifbaren Substanz von grossem Wert ist.

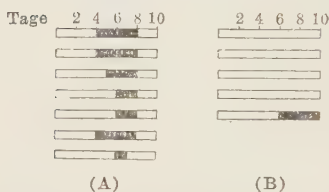
Tafel X.



Zunächst löste ich 1,4 g unverseifbare Substanz des Olivenöls in etwa 10 ccm Äther, um die unlösliche und lösliche Substanz voneinander zu trennen.

Wie Tafel X zeigt, kam es bei 4 Kücken, welchen 1/20 m.l.D. Diphtherietoxin und die in Äther unlösliche Substanz in 0,05 ccm Olivenöl eingespritzt war, ausnahmslos zur Beinlähmung. Dann wurde das Filtrat abgedampft und der Rückstand wurde in kalten Aceton (-10°C) gelöst. Auf dieser Weise kann man die in Aceton unlösliche Substanz von der löslichen trennen. Daraufhin unternahm ich den nächsten Versuch. In den Versuchen der Tafel X und XI verwendete ich 1/25 m.l.D. Diphtherietoxin und 14 mg unverseifbarer Substanz entsprechende Menge der geprüften Substanz in 0,05 ccm Olivenöl.

Tafel XI.



(Taf. B), die mit in Aceton unlöslicher Substanz behandelt waren, hervorgerufen wurde.

Nach diesem Versuch kann mit Sicherheit gesagt werden, dass die Substanz in der unverseifbaren Substanz, die in Äther löslich und in kalten Aceton unlöslich war, die Schutzkraft der Kücken gegen die Parese durch Diphtherietoxin verstärkt.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

Aus obigen Versuchen lässt sich die folgende Zusammenfassung aufstellen.

1. Bei den mit obiger Diät gefütterten Kücken ist die minimale Dosis zur Herbeiführung der Beinlähmung 1/30 m.l.D. Diphtherietoxin.

2. Im Versuch II, wieweit die Fütterung mit Olivenöl eine Wirkung auf das Auftreten der Beinparese hat, wurde nachgewiesen, dass die Fütterung mit Olivenöl in bestimmter Menge Kücken gegen die Parese als Folge von Diphtherietoxin zu schützen vermag.

3. In dem Versuch, welcher Bestandteil des Olivenöls die Schutzkraft gegen die Beinlähmung durch Diphtherietoxin ver-

stärkt, wurde festgestellt, dass die unverseifbare Substanz diese Wirkung zeigt.

4. Im Versuch IV untersuchte ich, ob die zunehmende Menge der unverseifbaren Substanz die Schutzkraft gegenüber der verstärkten Toxindosis aufbringt oder nicht. Ich steigerte die Toxindose bis auf 1/15 m.l.D. und erhöhte die Menge der unverseifbaren Substanz des Olivenöls bis auf 1,2%.

Aus diesem Versuch erkennt man, dass die Beinlähmung durch 1/15 m.l.D. Diphtherietoxin mit über 1,08% dem Futter zugesetzter unverseifbaren Substanz geschützt werden kann. Aber bei grosser Zufuhr der unverseifbaren Substanz des Olivenöls neigen die Kücken zur Körperschwäche.

5. Um die Kücken gegen die Parese durch die geringste Zufuhr der unverseifbaren Substanz zu schützen, wurde die unverseifbare Substanz in 0,05 ccm Olivenöl eingespritzt.

Als Ergebnis wurde bei Versuch V festgestellt, dass die unverseifbare Substanz bei Zufuhr durch die Injektion die grössere Schutzkraft gegen die Beinlähmung durch Diphtherietoxin hat, als bei oraler Zufuhr, und dass jedoch die Zufuhr einer grossen Menge durch Injektion nicht geeignet ist, weil die Körperschwäche der Kücken bei der Zufuhr durch Injektion häufiger als bei der oralen Zufuhr in Erscheinung tritt.

6. Weiter prüfte ich, welcher Bestandteil der unverseifbaren Substanz die Schutzkraft gegen das Toxin hervorbringt. Aus dem Versuch VI erkennt man, dass die Substanz in der unverseifbaren Substanz, die in Äther löslich und in kaltem Aceton unlöslich ist, gegen die Beinlähmung als Folge von Diphtherietoxin zu schützen vermag.

Zum Schluss spreche ich Herrn Prof. Dr. Y. Sueyoshi für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit und Herrn Prof. Dr. M. Karasawa für die lebenswürdige Unterstützung meinen besten Dank aus.

LITERATUR.

Sugiyama (1937): Gedächtnisabhandlung zum 15 jährigen Jubiläum des phychiatrischen Instit. der Keio-Universität, 430.

Tôda (1940): Mitteil. d. Tokyo medicin. Gesellsch. f. Ärztinn. X, No. 3.

ÜBER DAS VERHALTEN DES CHOLESTERINS IM BLUTE UND IM PLEURALERGUSSE BEI CHOLESTERINPLEURITIS.

VON

KENZO KUSUI UND KAZUO MUNEHISA.

(Aus der Medizinischen Universitätsklinik von Prof. Dr. S. Tsunoo,
Nagasaki.)

(Eingegangen am 23. April 1940.)

Seitdem Churton (1882) als Erster einen Fall von sogen. Cholesterinpleuritis beschrieben hat, ist das Vorkommen von Cholesterinkrystallen im Pleuralergusse kein seltener Befund (Tsunoo, 1938). Aber die Frage, warum das krystallinische Cholesterin im Pleuralergusse ausscheidet, bleibt heute noch dahingestellt. Sogar die Isolierung der ausgeschiedenen Cholesterinkrystalle und ihre chemische Untersuchung wurden bis heute kaum versucht.

Von 1932 bis 1937 hatten wir Gelegenheit, fünf einschlägige Fälle zu beobachten, deren klinische Beobachtungen schon von Kusui und Wei (1933), Kusui und Komatsu (1936), Iwata und Munehisa (1937), Hara und Munehisa (1938) und Sagara (1938) ausführlich mitgeteilt wurden. Weiter wurde nun hier bei diesen 5 Fällen das Verhalten des Cholesterins im Blute und im Pleuralergusse, besonders des im letzteren ausgeschiedenen, krystallinischen Cholesterins vom chemischen Standpunkt genau untersucht. Daneben wurde als Kontrollversuch auch der Cholesteringehalt des Blutes und des Pleuralpunktes an 10 Fällen von idiopathischer Pleuritis bestimmt.

Die Resultate werden im Folgenden mitgeteilt.

UNTERSUCHUNGSERGEBNISSE.

I. Der Gehalt des Gesamtblutes und des Pleuralergusses an Cholesterin und seinen Estern bei idiopathischer Pleuritis.

TABELLE

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	klinische Diagnose	Datum	Cholesterin im Gesamtblute				Menge cem	Aussehen	Spez. Gewicht bei 15°C
						Gesamt g%	Freies g%	Ester g%	Verestert %			
1	M.H.	21	♂	Pleuritis exsud. sin.	2.XII (32)	0,137	0,072	0,065	47,4	200	serös, klar	1,025
2	S.N.	19	„	Pleuritis exsud. dupl.	10.VIII (37)	0,134	0,072	0,062	46,2	10 (rechts)	„ „	—
3	K.E.	30	„	Pleuritis exsud. sin.	12.VIII (37)	0,131	0,081	0,050	38,1	500	serös, leicht getrüb	1,026
4	S.T.	55	♂	Lungentbe. mit Pleuritis exsud. sin.	27.VIII (37)	0,140	0,087	0,053	37,8	100	serös, klar	1,023
5	H.K.	18	♀	Pleuritis exsud. dupl.	31.IX (37)	0,152	0,088	0,064	42,1	10 (rechts)	„ „	—
6	S.I.	59	♂	„ „	6.X (37)	0,140	0,088	0,052	37,1	425 (links)	„ „	1,020
7	H.Y.	25	♀	„ „	9.X (37)	0,146	0,091	0,055	37,6	950 (rechts)	serös, leicht getrüb	1,016
8	T.O.	18	„	Pleuritis exsud. sin.	10.X (37)	0,156	0,095	0,061	39,1	10	„ „	—
9	M.M.	24	„	Pleuritis exsud. dupl.	13.X (37)	0,151	0,077	0,074	49,0	9 (rechts)	„ „	—
10	T.M.	17	♂	„ „	13.X (37)	0,135	0,085	0,050	37,0	1100 (rechts)	serös, klar	1,022

I.

Pleuralpunktat

Rivaltasche Probe	Eiweißgehalt (Sueyoshi) %	Zuckergehalt % (Hagedorn-Jensen)	NaCl-gehalt % (Ruszyák)	Gerinnbarkeit	mikroskopischer Befund					Cholesteringehalt			
					Leukozyten		Erythro- zyten	andere Formelemente	Cholesterin- krystalle	Gesamt g%	Freies g%	Ester g%	Verestert %
					Lympho- zyten	Polynuk- leäre							
(+)	5,0	0,075 (Bang)	0,68	(+)	spärlich		spär- lich	(-)	(-)	0,081	0,051	0,033	39,2
"	4,5	—	—	"	zieml. reichl.	(-)	zieml. reichl.	"	"	0,071	0,031	0,040	56,3
"	10,5	0,072	0,76	"	reich- lich	"	(-)	"	"	0,081	0,049	0,032	39,5
"	6,0	0,066	0,76	"	zieml. reichl.	spär- lich	"	"	"	0,089	0,053	0,036	40,4
"	6,5	0,083	0,72	"	"	(-)	"	"	"	0,063	0,033	0,030	47,6
"	6,0	0,072	0,68	"	ziemlich reichlich		zieml. reichl.	"	"	0,065	0,036	0,029	44,6
"	4,0	0,062	0,72	"	"	"	"	"	"	0,073	0,038	0,035	47,6
"	5,0	0,068	0,62	"	reichl.	(±)	(-)	"	"	0,060	0,031	0,029	48,3
"	5,5	0,065	0,72	"	spär- lich	spär- lich	"	"	"	0,059	0,034	0,025	42,3
"	6,5	0,077	0,68	"	zieml. reichl.	"	spär- lich	"	"	0,080	0,039	0,041	51,2

TABELLE

Nr.	Name	Alter	Geschlecht	klinische Diagnose	Datum	Cholesterin im Gesamtblute				Menge cem	Aussehen	Spez. Gewicht bei 15°C
						Gesamt g%	Freies g%	Ester g%	Verestert %			
1	T.M.	24	♂	Cholesterin-pleuritis	23.XI (32)	0,211	0,162	0,049	23,2	112	gelblich getrübe Flüssigkeit, in der feine seidenartig glitzernde Schuppen sichtbar	1,020
					2.XII (32)	0,154	0,101	0,053	34,4	33	glitzernde Schuppen sichtbar	1,020
					14.XII (32)	0,162	0,114	0,048	29,6	25	serös, klar	1,020
2	Y.S.	20	♂	Lungentbc. mit Cholesterin-pleuritis	5.VII (35)	0,147	0,095	0,052	35,4	20	gelblich getrübe Flüssigkeit, in der feine glitzernde Schuppen sichtbar	1,023
					21.VII (35)	0,176	0,100	0,076	43,1	45	**	1,023
3	H.S.	58	♂	Cholesterin-pleuritis mit Cirrhose cardiaque	15.VII (36)	0,130	0,090	0,040	30,7	35	gelbbräunlich getrübe und glitzernde Flüssigkeit	1,019
					25.VII (36)	0,143	0,104	0,039	27,0	—	—	—
4	H.R.	40	♂	Cholesterin-pleuritis	29.XII (36)	0,160	0,110	0,050	31,2	120	gelblich getrübe glitzernde Flüssigkeit	1,026
					9.I (37)	0,167	0,118	0,049	29,3	70	serös, leicht getrübt	1,026
					18.I (37)	0,187	0,120	0,067	35,8	22	serös, leicht getrübt	1,026
5	K.H.	66	♂	Lungentbc. mit Cholesterin-pleuritis	1.VII (37)	0,150	0,081	0,069	46,0	1000	gelblich getrübe Flüssigkeit, in der feine seidenartig glitzernde Schuppen sichtbar	1,026
					12.VII (37)	0,156	0,083	0,073	46,7	160	glitzernde Schuppen sichtbar	1,025

Bemerkungen: * Der Eiweissgehalt nach Kjeldahl bestimmt.

† Die Cholesterinbestimmung ohne Filtrierung der ausgeschiedenen

II.

Pleuralpunktat

Rivaltasche Probe	Eiweißgehalt (Sueyoshi) %	Zuckergehalt % (Hagedorn-Jensen)	NaCl-gehalt % (Rusznayák)	Gerinnbarkeit	mikroskopischer Befund					Cholesteringehalt g%			Gesamt
					Leukozyten		Erythrozyten	andere Formelemente	Cholesterin- krystalle	Freies als Krystalle aus- geschieden	in dem von den ausgeschied. Cholest.- krystallen befreiten Filtrat		
					Lympho- zyten	Polynuk- leäre					Freies	Ester	
(+)	4,6*	—	0,53	(—)	spärlich		spär- lich	(—)	(#)	2,86	0,039	0,035	2,934
"	4,4*	0,035 (Bang)	0,56	(—)	"		"	"	(+)	unmess- bar	0,083†	0,047†	0,130†
"	4,9*	0,041 (Bang)	0,54	(+)	spärlich		"	"	(—)	—	0,032	0,043	0,075
"	9,0	—	—	(—)	reich- lich	zieml. reichl.	(—)	"	(+)	unmess- bar	0,208†	0,072†	0,280†
"	8,5	—	—	(—)	"	"	—	—	(+)	"	0,211†	0,085†	0,296†
"	7,0	0,144	0,81	(—)	spärlich		spär- lich	(—)	(+)	0,155	0,045	0,033	0,233
—	—	—	—	—	—		—	—	—	—	—	—	—
(+)	9,0	—	0,67	(—)	spärlich		spär- lich	(—)	(+)	0,74	0,110	0,018	0,868
"	10,0	0,024	0,72	(—)	(—)	zieml. reichl.	(—)	(—)	(+)	unmess- bar	0,114†	0,035†	0,149†
"	10,0	0,034	0,80	(—)	spärlich		(—)	(—)	(+)	"	0,125†	0,046†	0,171†
"	6,5	—	—	(—)	spärlich		spär- lich	—	(#)	3,31	0,059	0,040	3,409
"	6,0	—	0,65	(—)	—		—	—	(#)	1,76	0,051	0,041	1,852

** Die Pleuralpunktion am 15.VII ausgeführt.

Cholesterinkrystalle nach Kusui ausgeführt.

Tabelle I zeigt die Resultate, die an 10 Fällen von idiopathischer Pleuritis gewonnen wurden. Dabei wurden das Cholesterin und seine Ester nach der von K. Kusui (1933) mitgeteilten gravimetrischen Methode bestimmt.

Aus Tabelle I ergibt sich, dass das Gesamtcholesterin im Gesamtblute zwischen 0,131 und 0,156% variiert und die Ester 37,0–49,0% des Gesamtcholesterins ausmachen. Diese Werte sind fast gleich den von Kusui (1937) angegebenen Cholesterinwerten im Gesamtblute bei gesunden Menschen. Das Gesamtcholesterin im Pleuralergusse schwankt zwischen 0,059 und 0,089% und die Ester machen 39,2–56,3% desselben aus. Wie man aus der Tabelle ersieht, werden dabei keine ausgeschiedenen Cholesterinkristalle nachgewiesen.

II. Das Verhalten des Cholesterins und seiner Ester im Gesamtblute und im Pleuralergusse bei Cholesterinpleuritis.

A. Blutcholesterin.

An 5 Fällen von Cholesterinpleuritis wurde das Blutcholesterin nach Kusui (1933) bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

In den meisten Fällen mit Ausnahme des 3. Falles sind die Gesamtcholesterinwerte etwas höher als die Werte der Tabelle I und auch die Werte, die früher von Kusui (1937) mitgeteilt wurden.

In 3 Fällen (Nr. 1, 3 und 4) wurde leichte Verminderung der Esterquote konstatiert, während in 2 Fällen (Nr. 2 und 5) die normale Esterquote beobachtet wurde.

Aus diesen Ergebnissen kann man ersehen, dass bei Cholesterinpleuritis der allgemeine Cholesterinstoffwechsel nicht auf normale Weise vorstatten geht.

B. Cholesterin im Pleuralergusse.

Der Pleuralerguss wurde gleichzeitig mit der Bestimmung des Blutcholesterins durch Punktion entleert. Die Flüssigkeit war stets gelblich und mehr oder weniger stark getrübt. Die Trübung

besteht aus feinen, seidenartig glitzernden Schuppen, die sich beim Stehenlassen auf den Boden des Glasgefäßes absetzen. Die mikroskopische Untersuchung ergibt, dass dieser Bodensatz hauptsächlich aus tafelförmigen Krystallen, die den Cholesterintafeln entsprechen, und ausserdem aus Erythrozyten und Leukozyten besteht (Tabelle II). Die abgesetzte krystallinische Masse wird auf Büchnerschem Trichter abgesaugt.

1. Das nun gewonnene Filtrat ist klar gelblich und bildet kein Gerinnsel. An diesem Filtrat wurde Bestimmung des spez. Gewichtes, des Eiweiss-, Zucker- und NaCl-Gehaltes sowie Rivalta-sche Probe ausgeführt. Weiter wurden freies und Estercholesterin in diesem Filtrat nach K. Kusui bestimmt. Die Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

2. Der abgesaugte Bodensatz wird aus heissem 90%igem Alkohol umkrystallisiert. Die gereinigten Krystalle bestehen aus schönen, perlmutterartig glänzenden Tafeln. Der Schmelzpunkt dieser Substanz befindet sich bei 146°C (Nr. 3)–147°C (Nr. 1, 4 und 5). Sie ist in Wasser nicht, in Äthylalkohol bei Kälte schwer, dagegen bei Wärme ziemlich leicht, in Äther, Chloroform und Azeton ganz leicht löslich. Sie gibt positive Salkowskische und Liebermann-Burchardsche Reaktion und wird nach Windaus mit Digitonin gefällt. Solche Eigenschaften sprechen schon nachdrücklich dafür, dass diese Substanz das freie Cholesterin ist. Wenn dieses wirklich der Fall ist, dann müssen der Formel $C_{27}H_{47}O$ entsprechend in dieser Substanz 83,85% C und 12,00% H enthalten sein. Nun ergibt die Elementaranalyse der 0,0507 g wiegenden Substanz, die beim ersten Fall gewonnen wurde, 0,1557 g CO_2 und 0,0534 g H_2O , was 83,74% C und 11,78% H entspricht. An den Präparaten Nr. 3, 4 und 5 wurde keine Elementaranalyse ausgeführt, sondern ihre genau gewogene Menge (4,8–5,0 mg) wurde in 5 ccm Alkohol gelöst und mit 2,0 ccm heisser 1%iger alkoholischer Digitoninlösung versetzt. Weiter bestimmte man nach Kusui (1933) das Cholesterindigitonid und prüfte, ob die Präparate Nr. 3, 4 und 5 durch Digitonin quantitativ ausgefällt werden können, was bei freiem Cholesterin der Fall sein muss. Die Resultate sind in Tabelle III zusammengestellt.

TABELLE III.

Präparat von	Zur Bestimmung gebrauchte Substanz- menge mg	Zugesetzte Digitonin- lösung cem	Cholesterindigitonid		Liebermann- Burchardsche Reaktion im Filtrat des Cholest.- Digit.
			Gefundene Menge mg	Berechnete Menge mg	
Nr. 4	5,0	2,0	20,2	20,0	(—)
Nr. 3	5,0	2,0	20,0	20,0	(—)
Nr. 5	I.	4,8	19,6	19,2	(—)
	II.	5,0	20,3	20,0	(—)

Also werden diese Substanzen mit freiem Cholesterin identifiziert.

Wie man aus diesen Ergebnissen ersieht, bestehen die im Pleuralergusse ausgeschiedenen Krystalle bei Cholesterimpleuritis ausschliesslich aus freiem Cholesterin. Aber in dem von den ausgeschiedenen Cholesterinkrystallen befreiten Filtrat befinden sich freies und Estercholesterin in gelöstem Zustande und ihre Menge weicht nicht besonders ab von der des freien resp. Estercholesterins im Exsudate bei idiopathischer Pleuritis, abgesehen von der ersten Punktion des 4. Falles.

C. Bemerkungen.

In der Anamnese der Fälle 1, 3 und 5 wird veraltete, seit mehreren Jahren nicht geheilte Pleuritis nachgewiesen. Also könnte man annehmen, dass bei diesen Fällen das Endothel der Pleura mehr oder weniger stark degeneriert wäre und die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Pleuralergusses beeinflussen könnte. Aber tatsächlich ergeben die mikroskopischen und auch die chemischen Untersuchungen der Pleuralergusse der Cholesterimpleuritis *ceteris paribus* keine Verschiedenheiten von der gewöhnlichen idiopathischen Pleuritis. Nur ist es auffallend, dass der Pleuralerguss bei der Cholesterimpleuritis beim Stehenlassen keine Gerinnbarkeit aufweist.

Bei 4 unter den 5 Fällen, mit alleiniger Ausnahme von Fall 3, bei welchem die Therapie auf Wunsch des Patienten unterbrochen werden musste, verschwanden durch wiederholte Punktion die

Cholesterinkrystalle im Pleuralergusse nach 0,5 2 Monaten und nach weiterer kurzer Zeit auch das Exsudat selbst.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei der idiopathischen Pleuritis variiert das Gesamtcholesterin im Gesamtblute zwischen 0,131 und 0,156% : dabei entspricht 37,0–49,0% des Gesamtcholesterins dem Estercholesterin. Das Gesamtcholesterin im Pleuralergusse schwankt zwischen 0,059 und 0,089% und die Ester machen 39,2–56,3% desselben aus.

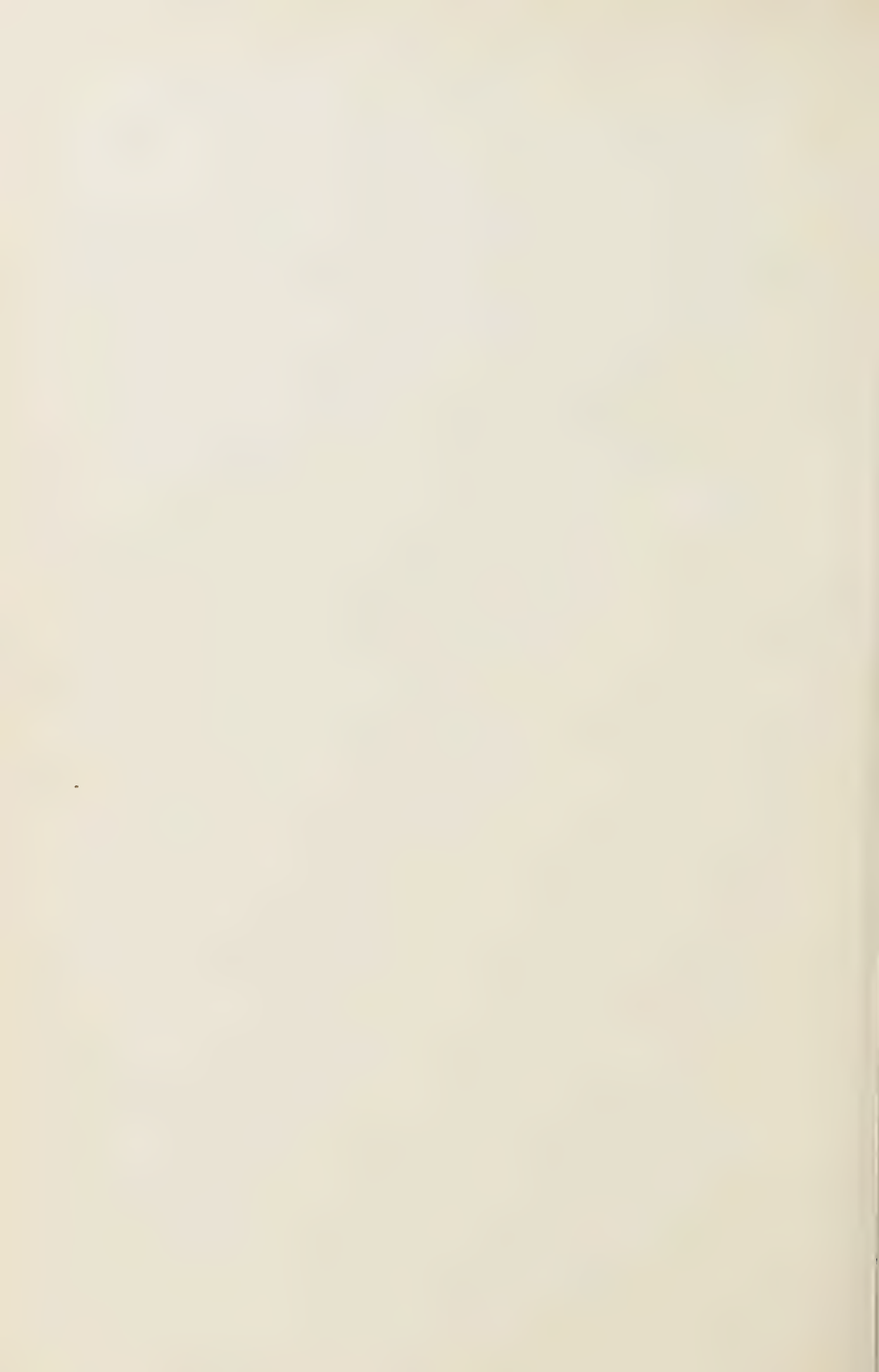
2. In 4 unter den 5 Fällen von Cholesterinpleuritis sind die Gesamtcholesterinwerte im Gesamtblute etwas höher als die Werte bei der idiopathischen Pleuritis bzw. beim normalen Menschen. In 3 Fällen wird leichte Verminderung der Esterquote konstatiert, während in 2 Fällen die normale Esterquote beobachtet wird.

3. Die im Pleuralergusse ausgeschiedenen Krystalle bei Cholesterinpleuritis bestehen ausschliesslich aus freiem Cholesterin. Aber in dem von den ausgeschiedenen Cholesterinkrystallen befreiten Filtrat befinden sich freies und Estercholesterin in gelöstem Zustande.

Jedenfalls ist es bei der Cholesterinpleuritis bemerkenswert, dass die im Pleuralergusse ausgeschiedenen Krystalle aus nur freiem Cholesterin allein bestehen, dass der Pleuralerguss keine Gerinnbarkeit aufweist und dass die Genesung durch wiederholte Punktion meist ziemlich schnell erfolgt. Die Frage aber, wodurch eigentlich die krystallinische Ausscheidung des freien Cholesterins aus dem Pleuralergusse zustande kommt, bleibt einstweilen dahingestellt.

LITERATUR.

- Churton, T. (1882): Transactions of the Clinical Society of London, **15**, 19. zit. nach Ruppert (1908): Münch. Med. Wschr., **10**, 510.
Hara, T. und K. Munehisa (1938): Nagasaki Igakkwai Zasshi, **16**, 871.
Iwata, Y. und K. Munehisa (1937): ebenda **15**, 896.
Kusui, K. und I. C. Wei (1933): ebenda **11**, 924.
Kusui, K. (1933): J. of Biochem., **18**, 227 und 237.
Kusui, K. und T. Komatsu (1936): Nagasaki Igakkwai Zasshi, **14**, 1300.
Kusui, K. (1937): J. of Biochem., **25**, 461.
Sagara, J. (1938): Kekkaku, **16**, 839.
Tsunoo, S. (1938): Nihon Igakkwai Kaisi, **10**, 464.



ÜBER DAS SCHICKSAL DER α -DEHYDROHYO- DESOXYCHOLSÄURE IM KANINCHENORGANISMUS.

VON

TANENAO MORI.

(Aus dem biochemischen Institut Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 23. April 1940)

Seitdem die Epimerisierung der sekundären Alkoholgruppe in der Stellung am C₃ des Gallensäuremoleküls im Krötenorganismus von K. Yamasaki u. K. Kyogoku (1935) aufgefunden wurde, hat man das Schicksal einer Reihe von Gallensäurederivaten, insbesondere der Ketogallensäuren in verschiedenen Tierorganismen untersucht, um nach Shimizu'scher Ansicht (1938) den Chemismus der Gallensäurebildung aus Steriode bzw. Vitamin D zu erkennen. Vor allem hat S. Miyazi (1938) die β -Dehydrohyodesoxycholsäure dem Kaninchenorganismus verabreicht und aus seinem Harn eine total hydrierte β -3- α -6-Dioxyallocholansäure vorgefunden, während eine partiell hydrierte β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure von Tukamoto (1939) aus dem Harn der Kröten erhalten wurde, denen α -Dehydrohyodesoxycholsäure einverleibt wurde. Tukamoto (1939) hat auch dabei die interessante Beobachtung gemacht, dass die dem Kaninchenorganismus verabreichte α -3-Oxy-6-ketocholansäure unter Epimerisierung als β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure im Harn ausgeschieden wurde, was mit dem Ergebnis von K. Kyogoku (1937) ganz übereinstimmt. In der vorausgegangenen Mitteilung (1935) habe ich berichtet, dass aus dem Harn der Kaninchen, denen die 12-Keto-3-cholensäure verabreicht wurde, freie Desoxycholsäure in ziemlich guter Ausbeute erhalten wurde.

Diese Säure wurde damals als ein Umwandlungsprodukt der verabreichten Ketocholansäure angenommen; wohl aber könnte der eigentliche Gallenbestandteil der Kaninchengalle, die Glykocholeinsäure, unter Vergiftung der Organe, insbesondere der Leber, durch

Zufuhr von körperfremden Gallensäurederivaten in ihre Komponente gespalten, im Harn ausgeschieden werden.

Einerseits um diese Möglichkeit zu prüfen und andererseits um einen Beitrag zur Kenntnis des Schicksals der Ketogallensäure im Tierkörper zu bekommen, wurde hier eine Menge der 3.6-Diketochohansäure den 27 Kaninchen einverleibt und deren Galle sowie Harn genau beobachtet. Aus der angesammelten Galle (80 ccm) wurde neben einer Glykchoholsäure eine kleine Menge von α -3.6-Dioxyallochohansäure vom Schmelzpunkt 247° (Sugiyama, 1937) vorgefunden, während aus dem Harn (35 l.) keinerlei krystallisiertes Gallensäurederivat erhalten wurde. Diese Dioxysäure muss zweifellos von der verabreichten α -Dehydrosäure herkommen, was für die Umwandlung der Chohansäurereihe in die Allochohansäurereihe im Tierkörper beweiskräftig sein soll. Die verabreichte α -Diketosäure dürfte aber der Hauptmenge nach im Kaninchenorganismus ausgenutzt worden sein, wie es von Miyazi (1938) und Tukamoto (1939) angenommen wurde.

Der Unterschied, dass die α -3.6-Dioxyallochohansäure einerseits in der Galle, die β -3- α -6-Dioxyallochohansäure (1938) andererseits im Harn nachgewiesen wurde, könnte in der Weise erklärt werden, dass die 3.6-Diketochohansäure im Kaninchenorganismus viel leichter verwertet und nicht so sehr in eine körperfremde β -Dioxysäure verwandelt werden konnte als die 3.6-Diketoallochohansäure. Daher dürfte die α -Dioxysäure nicht nur hierbei in nicht nachweisbarer Menge im Harn ausgeschieden, sondern auch die in der Galle aufgefundene α -Dioxyallochohansäure wohl weiter im Kaninchenorganismus benutzt werden, was eine viel geringere Ausbeute an genannter Dioxysäure zur Folge haben könnte.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

2,0–2,5 kg wiegenden gesunden Kaninchen, die mit "Okara" aus Sojabohnen und mit Gemüse gefüttert worden waren, wurden 5–10 ccm einer 1%igen Natrium- α -dehydroxydesoxycholatlösung täglich einmal intravenös injiziert, nach 5–6 maliger Injektion wurden die Kaninchen (insgesamt 27) getötet und ihre Gallenblasen herausgenommen.

Die dabei injizierte Ketogallensäure betrug 18 g. Die angesammelte Blasengalle, die 80 ccm betrug, wurde unter Zusatz von 300 ccm Alkohol vom Mucin befreit, zu ca. zwei drittel des ursprünglichen Volumens eingeeengt und mit verdünnter Salzsäure angesäuert, wobei beim Stehen eine Krystallisation auftrat, die sich als Glykcholeinsäure erwies.

α -3.6-Dioxyallocholansäure: Das von dem Krystall abfiltrierte Filtrat wurde nach Neutralisation mit einer 5%igen Sodalösung abgedampft und getrocknet. Der Rückstand wurde mit Alkohol extrahiert und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Petroläther mehrmals geschüttelt. Die alkoholische Schicht wurde nach wiederholter Neutralisation durch Abdampfen auf dem Wasserbad von Alkohol und Petroläther befreit und dann unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure erschöpfend ausgeäthert.

Der vereinigte Ätherauszug wurde mit Wasser gewaschen und eingeeengt. Die dabei abgeschiedenen Krystalle wurden aus Aceton-Wasser mehrmals unkrystallisiert. Schmelzpunkt 247°C . Ausbeute ca. 13 mg. Sie zeigten mit β -3-Oxy-6-ketoallocholansäure deutliche Depression, aber keine mit α -3.6-Dioxyallocholansäure. Liebermann-Reaktion: schmutzig violett.

4,368 mg Subst.: 11,737 mg CO_2 , 4,028 mg H_2O .

$\text{C}_{21}\text{H}_{40}\text{O}_4$

Ber. C 73,41 H 10,27

Gef. " 73,28 " 10,32.

LITERATUR.

- Kyogoku, K. (1937): Zs. physiol. Chem., **250**, 253.
Miyazi, S. (1938): Zs. physiol. Chem., **254**, 104.
Mori, T. (1939): Zs. physiol. Chem., **258**, 143.
Shimizu, T. (1938): Vortrag im Jap. Assoc. for the Advancement of Science in Tokyo im Mai.
Sugiyama, G. (1937): J. of Bioch., **25**, 157.
Tukamoto, M. (1939): Zs. physiol. Chem., **260**, 210; J. of Bioch., **30**, 337.
Yamasaki, K. u. Kyogoku, K. (1935): Zs. physiol. Chem., **233**, 29; **235**, 43.

BILDUNG VON DESOXYCHOLSÄURE AUS CHOLSÄURE BEI FÄULNIS DES PANKREAS.

VON

TANENAO MORI.

*(Aus dem biochemischen Institut der med. Fakultät Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 23. April 1940)

F. Mylius hat im Jahre 1886 angegeben, dass, wenn die Cholsäure mit der Pankreasdrüse zur Fäulnis gebracht wird, eine um einen Sauerstoff ärmere Gallensäure, die Desoxycholsäure entsteht.

Später hat A. Ekblom (1906) die mit verschiedenen Reduktionsmitteln ausgeführten Experimente an der Cholsäure beschrieben. Dabei hat er aus Cholsäure keine Desoxycholsäure erhalten. Damals war es eine kaum zu lösende Aufgabe, die reine, von Choleinsäure (1886) und damit auch von Desoxycholsäure (1886) freie Cholsäure darzustellen.

Erst im Jahre 1916 ist es Wieland u. Sorge gelungen, die Choleinsäure von Latschinoff (1885) als ein Additionsprodukt der Desoxycholsäure mit Margarinsäure sicher festzustellen und reine, von Desoxycholsäure freie Cholsäure aus der Galle zu gewinnen.

Dann haben Wieland und Sorge (1916) den Myliusschen Fäulnisversuch mit absolut reiner Cholsäure einmal wiederholt. Dabei wurde keine Desoxycholsäure gefunden und von ihnen erklärt, dass trotz des Misserfolges der biologische Übergang der Cholsäure in Desoxycholsäure nicht unmöglich sei.

Um festzustellen, ob die Cholsäure bei Fäulnis fermentativ in Desoxycholsäure reduziert werden kann, wurde die reine Cholsäure mit der Pankreasdrüse in Fäulnis versetzt und aus dem Fäulnisprodukt Desoxycholsäure (0.7 g aus 15 g Cholsäure) in ziemlich guter Ausbeute erhalten.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

15 g reine Cholsäure wurden in berechneter Menge von $N/10$ Natronlauge gelöst und als 1%ige Natriumcholatlösung zum Versuch verwendet. 300 ccm dieser Lösung wurde in Erlenmeyerischen Kolben mit 120 g frisch制备etem Pankreasbrei versetzt und im Freien vom 15. Juni an 2 Monate lang stehen gelassen. Dabei wurde der Kolben immer täglich einmal gut geschüttelt und immer festgestellt, ob die Lösung alkalisch reagierte. Inzwischen wurde das Reaktionsgemisch bakteriologisch untersucht und gefunden, dass bei der Fäulnis des Pankreas die Colibazillen üppig gewachsen waren. Insgesamt wurden 5 Versuche dieser Reihe gleichzeitig ausgeführt.

Diese 5 Reaktionslösungen wurden auf dem Wasserbade gut abgedampft, getrocknet und mit 1500 ccm Alkohol extrahiert. Der alkoholische Extrakt wurde mit elektrischem Föhn abgedampft, der Rückstand wieder mit absoluten Alkohol ausgezogen. Der Alkoholauszug wurde stark eingeengt, mit doppelter Menge von Wasser verdünnt und unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure mit Petroläther geschüttelt, um das Fett zu entfernen.

Die alkoholische Lösung wurde mit einer 2%igen Ammoniaklösung abgestumpft und auf dem Wasserbade von Alkohol und Petroläther abgedampft. Die Lösung wurde unter Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert und dabei aus dem Ätherauszug eine schmierige Masse erhalten. Diese Masse wurde wieder in Ammoniaklösung gelöst und unter nochmaliger Ansäuerung mit verdünnter Salzsäure ausgeäthert. Diese Behandlung wurde einmal wiederholt. Der Ätherauszug wurde mit Wasser gewaschen, dann mit verdünnter Ammoniaklösung geschüttelt, der ammoniakalische Auszug durch Erwärmen vom Äther befreit und mit einer 10%igen Bariumchloridlösung ausgefällt.

Diese getrocknete Bariumfällung von 1.6 g wurde mit Alkohol extrahiert, der Alkoholauszug nach dem Abdampfen des Alkohols mit einer 5%igen Sodalösung 2 Stunden lang ungekocht und abfiltriert. Das Filtrat wurde mit verdünnter Salzsäure angesäuert, die dabei abgeschiedene Fällung gut getrocknet, in fünf-facher Menge von Eisessig gelöst und stehen gelassen.

Der dabei abgeschiedene Krystall betrug 0,7 g. Nadeln vom Schmelzpunkt 145°C. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Essigcholeinsäure. Liebermann-Burchardsche Reaktion: gelborangerot.

spec. Drehung: 59,9 mg Subst., 10 ccm absolt. Alkohol, 2 dm,

$\alpha = +0,62$, $[\alpha]_D^{20} = +51,75^\circ$

3,635 mg Subst.: 9,220 mg CO₂, 3,200 mg H₂O.

C₂₄H₄₀O₄.CH₃COOH

Ber. C 68,97 H 9,80

Gef. " 69,18 " 9,85.

Diformylester:

0,2 g Essigcholeinsäure wurde in 5 ccm reiner Ameisensäure gelöst und auf dem Wasserbade 3 Stunden gekocht. Die Reaktionslösung wurde in 50 ccm Wasser eingegossen und die dabei erhaltene Fällung aus Alkohol-Wasser umkrystallisiert.

Lange Nadeln vom Schmelzpunkt 192°C. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Diformyl-desoxycholsäure.

3,840 mg Subst.: 9,810 mg CO₂, 3,030 mg H₂O.

C₂₀H₃₀O₆

Ber. C 69,64 H 8,93

Gef. " 69,67 " 8,83.

Der Ester wurde mit 5%iger Kalilauge 3 Stunden lang hydrolysiert. Die durch Ansäuern mit verdünnter Salzsäure aus dem Hydrolysat erhaltene Säure wurde aus Eisessig umkrystallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 145°C. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Essigcholeinsäure.

Xylolcholeinsäure:

0,1 g der Säure wurden in 5 ccm Xylol auf dem Sandbad unter Rückfluss gekocht. Beim Abkühlen ist ein Nadelkrystall vom Schmelzpunkt 181°C aus der Reaktionslösung abgeschieden. Keine Schmelzpunktdepression mit reiner Xylolcholeinsäure.

LITERATUR.

Ekbohm, A. (1906): Z. physiol. Chem., **50**, 101.

Latschinoff, (1885): Ber. chem. Ges., **18**, 3039.

Mylius, F. (1886): Ber. chem. Ges., **19**, 377.

Mylius, F. (1886): Ber. chem. Ges., **19**, 374.

Wieland, H. u. Sorge, H. (1916): Z. physiol. Chem., **97**, 16.

Wieland, H. u. Sorge, H. (1916): Ebenda, **98**, 60.

STUDIES ON BLOOD AND URINARY AMYLASE.

I. A new estimation method of urinary amylase, and amylase excretion from normal human kidney.

By

MASAMITU TAMAI.

(From the Fourth Department of Internal Medicine of Tokyo Imperial University. Director: Prof. F. Shionoya.)

(Received for publication, April 25, 1940)

Although amylase is a constant constituent of blood plasma, its physiological rôle is not clear. Some authors say that it is an indifferent substance, overflowing, so to speak, from the pancreas into blood vessels. But another suggestion may be offered with equal probability, that it is intimately related to the liver (and the muscle, etc.) amylase, and plays a part in glycogen metabolism.

Amylase is also a constant element of urine. Its concentration is small, but it is an interesting excretory substance because of the characteristics: 1. Its origin is entirely endogenous; 2. It is a colloidal substance; 3. It is osmotically inactive; and 4. It seems to be neither a substance like urea, which must necessarily be excreted from the kidney, nor a substance like glucose, which must be retained by all means at the threshold of the kidney. In other words, amylase seems to be an indifferent excretory substance. Thus the study of the mechanism of amylase excretion is not only interesting in itself, but also may contribute to research on the mechanism of kidney function in general.

On the other hand, we may investigate from a clinical viewpoint. As already confirmed, blood and urinary amylase increases strikingly in acute pancreatic diseases. In various other diseases, it likewise shows some characteristic variations. Therefore the estimation of blood and urinary amylase is interesting for diagnosis, prognosis and therapy.

The greater part of the communications hitherto advanced

are however quite ambiguous, for most investigators have adopted Wohlgemuth's principle of semiquantitative estimation. The conclusions reached by this inexact system of observation are naturally ambiguous and even contradict each other.

I have estimated the blood and urinary amylase both of normal subjects and of patients with various diseases. For the estimation of blood amylase, I have used a modification of Ottenstein's method; and for the urinary estimation, I have designed a method, simple (useful for clinical purposes) and yet accurate. In the present paper, my determination method is described, and some studies on normal subjects are reported.

ESTIMATION METHOD OF URINARY AMYLASE.

Principle. Glycogen is digested by urinary amylase under definite conditions. The increase of reducing force is estimated with the alkaline picric acid method. The amylase activity is indicated by the increase of reducing force in terms of glucose equivalence. With regard to urinary amylase, the chief problem is the total amount which is excreted in a unit time. Its concentration is less important.

Reagents:

1. Sample. Urine. It is convenient to dilute the urine, which is excreted during one hour, into 200 cc. with water. When amylase concentration is small, or when the urine volume exceeds 200 cc. per hour, the estimation should be performed without dilution. On the contrary, if amylase concentration is high, the urine should be diluted so that the reducing force after digestion becomes about 1.0 mg glucose equivalent.

2. Standard solution. Glucose solution, 1.0 mg per cc. It can be preserved with toluene for at least 3 months.

3. A 2% Glycogen solution. Any usual commercial preparation is satisfactory for use.

4. A 0.6% Picric acid solution.

5. A 5% Sodium hydroxyde solution.

Sørensen's phosphate buffer of pH 7.0, concentration being 0.15 M.

Procedure: 5 cc. of the sample and 5 cc. of buffer solution are pipetted into a small vessel, and 5 cc. of glycogen solution in another. They are put in a thermostat at 33°C. When their temperature becomes 33°C, they are mixed. Immediately after, and again 40 minutes after, the mixing, 1 cc. of the mixture is taken out into a test tube, which contains 1 cc. of picric acid solution and 0.5 cc. of caustic soda solution. Then the test tube is put in a boiling water bath for 10 minutes. After cooling, the contents are diluted with water to 25 cc., and colorimetriced against the standard glucose solution, which is similarly treated with picric acid. Put the readings of reducing force immediately after and 40 minutes after the mixing as A_0 and A_{40} respectively (in glucose equivalence), $A_{40}-A_0$ is the activity of amylase, contained in 1.3 cc. of the diluted sample. The total amylase activity, excreted in a definite time interval is

$$(A_{40}-A_0) \times 3 \times \text{number of cc. of the diluted sample.}$$

Notes:

1. The usual boiling water bath is sufficient. Special conditions are not necessary, as Baltzer pointed out in his modification of Ottenstein's method.

2. In Benedict and Osterberg's picric acid method of glucose estimation, a few drops of acetone are added. In the present method, acetone is not used, for, in my work the increase of reducing force is estimated, but the absolute value of reducing force is out of the question.

3. The test tube is put in a boiling water bath for 10 minutes. But the time of immersion need not be so strict. 8 minutes will do, while 15 minutes also will do.

4. Picramic acid, the reduction product of picric acid, is very stable. After cooling, the test tube can be left for several hours for colorimetry.

5. Proteinuria and jaundice urine do not disturb the estimation. Deproteination is unnecessary.

6. Pipetting of picric acid and caustic soda need not be so exact.

7. Urine can be left for several hours without any change in amylase activity.

8. The reproducibility of the reading is within about 5 percent.

9. At the end of 40 minutes of reaction, the velocity of amylasic digestion does not diminish.

10. When the reading remains within 1.0 mg of glucose equivalence, it is inversely linearly proportional to the dilution, that is, in linear proportion to the amylase content.

RESULTS OF ESTIMATIONS OF URINARY AMYLASE OF NORMAL SUBJECTS.

I have examined the urinary amylase of normal persons with my estimation method. Materials were the urine of myself, of my colleagues and of a few convalescent patients. All of them were healthy and had no pathological signs in urine. The estimations were performed within one or two hours after each urination.

Data of estimations are shown in Tables I, II, III & IV, from which we can deduce the following facts.

1. The Amylase amount which a certain person excretes in a definite time interval (1 hour for example), is strikingly constant. It holds the same value for at least 2 or 3 months. (Tables I, II, III & IV.)

2. Urine volume (diuresis) has hardly any influence upon amylase excretion, except that, when urine volume is markedly large and especially when diuresis takes place suddenly, amylase excretion increases somewhat. (Table I.) Therefore in the study of urinary amylase, the amount excreted in a unit time should be examined, while concentration is less significant. In the information of previous investigators, however, concentration was emphasized chiefly and urine volume was rather ignored.

3. The upper and lower limits of personal difference are, in Table II, 600 and 252 respectively. There is an individual difference of about 100 percent. (Table II.) I can scarcely find any relationship between amylase excretion and age, sex, body weight, body surface area, etc.

TABLE I.
Urine volume and Amylase activity.

	O'clock	Urine vol. c.c./hour	Amylase activity
age 33 ♂	11.52-12.20	300	504
	11.01-11.33	150	504
	10.19-11.01	66.0	486
	12.10-13.10	48.0	414
	10.14-12.17	37.2	510
	14.50-15.50	22.2	462
age 26 ♂	13.30-15.42	156	408
	10.54-13.30	88.8	408
	19.30-20.42	48.0	384
	19.00-21.38	24.6	372
age 25 ♂	12.47-14.17	132.0	360
	10.52-12.47	50.4	348
age 18 ♂	12.02-14.06	192	336
	10.06-12.02	36.0	324

TABLE II.
The individual deviation.

Age	Sex	Amylase activity	which is the average of
58	♂	252	
28	♀	267	(240, 294)
18	♀	270	
28	♂	282	(300, 270, 276)
18	♂	294	
18	♂	324	(312, 324, 336)
25	♂	376	(360, 360, 408)
25	♂	399	(390, 408)
28	♂	406	(420, 390, 408)
33	♂	406	(384, 408, 420)
23	♂	452	(438, 444, 474)
55	♂	528	
22	♂	544	
26	♀	600	

TABLE III.
The influence of meals.

O'clock	Urine vol. c.c./hour	Amylase activity	O'clock	Urine vol. c.c./hour	Amylase activity
age 33 ♂			17.10-18.23	43.0	510
6.35- 9.15	78.0	396	18.00-18.10	meal(supper)	
8.25- 8.35	breakfast		18.23-19.41		486
9.15- 9.45	198.0	576	19.41-21.01		480
9.45-13.30	22.8	540	age 26 ♂		
8.25- 8.35	breakfast		9.15- 9.25	breakfast	
8.52- 9.20	60.0	360	9.13- 9.52	69.0	408
9.20- 9.20	108.0	504	9.52-10.52	108.0	360
9.50-10.20	60.0	384	10.52-12.47	50.4	348
10.20-10.53	40.2	384	12.10-12.20	meal(noon)	
7.30- 7.40	breakfast		12.47-14.17	132.0	360
7.52- 8.25	96.0	624	7.40- 8.50	49.8	360
8.25- 8.40	480.0	624	8.50- 9.00	breakfast	
13.30-14.23	30.6	420	8.50- 9.26	51.6	372
5.25- 9.25	40.2	396	9.26-10.54	48.6	372
9.15- 9.25	breakfast		age 28 ♂		
9.25- 9.55	30.0	480	8.38- 9.24	82.2	420
9.55-10.25	55.8	442	8.38- 8.48	breakfast	
10.25-11.01	36.6	408	9.24-10.54	99.0	396
10.14-12.17	37.2	516	10.54-13.00	88.7	408
12.05-12.15	meal		age 18 ♂		
12.17-13.02	31.8	528	8.10- 8.20	breakfast	
13.02-14.02	33.0	492	8.09- 8.46	47.4	276
10.00-11.00	35.0	432	8.46- 9.25	64.8	396
12.35-12.45	meal(noon)		9.25-10.06	48.6	312
12.15-12.52	30.0	432	10.06-12.02	36.0	324
13.45-14.45	45.0	420	12.00-12.10	meal(noon)	
10.14-12.17	37.2	522	12.02-14.06	192.0	336
12.05-12.15	meal(noon)		8.15- 8.25	breakfast	
12.17-13.02	31.8	528	8.27- 9.03	120.0	336
13.02-14.02	33.0	492	9.03-10.07	111.0	324

TABLE IV.
Day-night rhythm.

O'clock	Urine vol. c.c./hour	Amylase activity	O'clock	Urine vol. c.c./hour	Amylase activity
age 33 ♂			6.08- 7.28	15.0	372
11.21-12.34	77.3	456	7.28- 8.39	16.8	372
12.20-12.30	meal		3.30- 6.08	52.4	372
17.10-18.23	35.3	516			
18.00-18.10	meal		age 27 ♂		
18.23-19.41	31.5	492	16.20-18.05	33.6	336
19.41-21.01	24.8	480	18.05-19.30	108.0	372
21.01-22.35	30.0	432	19.30-20.40	46.0	384
22.35-23.35	25.0	334	20.40-22.20	26.4	288
23.35- 0.30	20.6	396	22.20- 0.10	19.8	288
2.05- 5.36	27.2	372	0.10- 7.52	23.4	252
5.36- 6.37	36.5	408	7.52- 8.49	49.8	276
6.37- 8.06	30.9	384	8.40- 8.49	breakfast	
8.06- 8.56	27.6	360	8.49- 9.54	47.4	312
8.56- 9.36	30.0	456	9.54-11.54	48.6	300
9.00- 9.10	breakfast				
9.36-11.03	70.3	480	8.38- 9.24	82.2	420
			8.38- 8.48	breakfast	
11.10-12.15	42.0	516	9.24-10.54	99.0	396
12.15-12.25	meal		10.54-13.30	88.7	408
12.15-14.43	37.8	552	13.30-15.42	156.0	408
14.43-18.19	23.4	456	15.42-19.00	50.4	408
18.19-22.20	21.0	480	19.00-21.38	24.6	372
22.20-23.45	14.4	396	21.38-23.33	30.0	312
1.06- 5.15	12.6	372	23.33- 7.12	22.8	312
5.15- 6.08	13.8	324	7.12- 8.28	42.6	276

4. Influence of meals. From Table III, it seems that amylase excretion begins to increase about 40 minutes after eating (breakfast) and continues for 30 minutes to 1 hour. But this increase without exception accompanies the rapid increase of urine volume, and there is no increase without diuresis. As stated above, when diuresis suddenly occurs amylase excretion increases. Therefore

the increase after meals is the influence of diuresis but not of the meals themselves. Moreover, as I shall report in the next paper, blood amylase also does not increase after meals. Some previous papers have reported that amylase excretion increases after meals, but I have not found it so.

Table IV shows that amylase excretion always decreases at night by about 20 percent of the day-time value; there is a diurnal rhythm, which is entirely independent of the diurnal rhythm of urine volume. At night, when urine volume sometimes remains large, amylase excretion becomes still lower. On the contrary, in the day-time, the volume may become very small, and yet the amylase value does not diminish. Again, this lowering of amylase excretion is not due to the drop of the level of blood amylase, because the blood amylase value is quite constant throughout the 24 hours. Thus the diurnal rhythm of amylase excretion is a resultant phenomenon of the diurnal rhythm of kidney function in general. The rhythm in the day-time usually begins from breakfast and continues to about 10 o'clock at night. When we examine urine for clinical purposes we are apt to take as a sample the urine which is secreted before breakfast. But this is often an unsuitable specimen, because of the above reason.

SUMMARY.

1. A new estimation method for urinary amylase, simple and accurate, is introduced.
2. Amylase values, which a given normal person excretes in a definite time interval, is strikingly constant, in spite of variations of urine volume.
3. The personal deviation is about 100%.
4. Amylase excretion is not influenced by meals.
5. There is a diurnal rhythm of amylase excretion, decreasing at night. It is due to the diurnal rhythm of the excretory function of the kidney.

LITERATURES.

- Adam, A.: *Klin. W.*, **1923**, 1548.
Baltzer: *Klin. W.*, **1935**, 929.
Baumann, J. (1929): *Klin. W.*, **1929**, 982; *Dtsch. Z. Chir.*, **216**, 98.
Cohen, I. (1925): *Brit. J. exp. Pathol.*, **6**, 173.
Fischer, O. (1933): *Z. exp. Med.*, **86**, 258.
Foged, J. (1932): *Acta chir. Scand. (Stockh)* **69**, 451; *Hosp. tid.*, **1931**, 991, **1932**, 677.
Nørby, G.: *Hosp. tid.*, **1932**, 1281.
Reid, C. (1925): *Brit. J. exp. Pathol.*, **6**, 314.

STUDIEN ÜBER DIE ZAHNSTEINBILDUNG (I).

VON

MASAO KUSUNOKI.

(Aus dem Biochemischen Institut der Kaiserlichen Universität zu Tokyo.
Vorstand: Prof. S. Kakiuchi.)

(Eingegangen am 26. April 1940.)

Unter Zahnstein versteht man bekanntlich Konkremeute von verschiedener Härte und Farbe welche sich an bzw. um die Zahnoächen niederschlagen.

Sie erreichen manchmal bedeutende Dimensionen, so dass es zur vollständigen Einbettung ganzer Zähne, ja sogar ganzen Zahnreihen, auch künstliche Zahnersatzstücke einschliessend, kommen kann.

In der Literatur finden wir mehrere Theorien über die Zahnsteinbildung, welche sich folgendermassen zu vier Gruppen zusammenfassen lassen.

1. Der normale menschliche Speichel enthält eine beträchtliche Menge von sowohl Kalziumphosphat als auch von Kalziumkarbonat, welche, entsprechend dem freien Kohlensäure-Gehalt, in Lösung gehalten werden. Beim Entweichen der Kohlensäure in die Mundhöhle wird ein Teil der Kalziumsalze im Speichel niederschlagen.

2. Eiweissartige Konkremeute des Speichels schlagen sich unter verschiedenen Momenten an den Zähnen nieder, und bilden den Kern des Zahnsteins.

3. Die Kalziumsalze im Speichel befinden sich im metastabilen Übersättigungszustand und ein Teil davon wird leicht als Niederschlag ausgeschieden.

4. Die Kalziumsalze, welche im Speichel gelöst enthalten sind, schlagen sich mit den Spaltungsprodukten der Mundflora und den abnormen Sekreten der Mundschleimhaut nieder.

In neuerer Zeit teilt Ōyama (1927) mit, dass die Häufigkeit

der Zahnsteinbildung keine besondere Beziehung zu dem spezifischen Gewicht, der Reaktion, Viskosität, Ca-Menge und Epithelzellenzahl des Speichels beobachten lässt.

Bibby (1935) wollte mit der Darstellung künstlichen Zahnsteins zeigen, dass Konkrementbildung nur in Gegenwart beider Momente der physikalisch-chemischen und bakteriologischen Wirkung stattfinden.

Meiner Ansicht nach, muss sicher irgend eine Beziehung zwischen der Zusammensetzung des Speichels und dem Vorkommen der Zahnsteinbildung bestehen und eine unbefangene Beurteilung in dieser Hinsicht scheint den ersten Angriffspunkt dieser Probleme zu bieten.

I. VERGLEICH DER ZUSAMMENSETZUNG DES SPEICHEL DER ZAHNSTEINREICHEN MIT DER SONSTIGER PERSONEN.

Zunächst wurde ein Vergleich an Zusammensetzung des Speichels der reich an Zahnstein leidenden Personen mit der normalen bzw. wenig an Zahnstein leidenden unternommen, um einen etwaigen Unterschied zu finden.

Der Speichel wurde in geschlossener Mundhöhle möglichst unter natürlichen Bedingungen angesammelt und in gut zugestopfter Flasche aufbewahrt.

Die Speichelsammlung geschah jedesmal bei allen Untersuchungen binnen 30 Minuten und zwar um 11,0°–11,30° vm., soweit sie alle um 7,0°–8,0° vm. ihr Frühstück eingenommen hatten.

Bei den Voruntersuchungen hatte sich dieser Zeitabschnitt zu unserem Zweck am geeignetsten erwiesen, da er bei demselben Person immer gleichartigen Speichel ergab. Um einen möglichst von Speiseresten freien Speichel zu bekommen, wurde unmittelbar vor der Speichelsammlung dreimaliges Gurgeln mit je 20 ccm künstlichem Speichel (Na 46 mg, Ca 10 mg, PO_4 13,9 mg, Mg 0,9 mg, KCNS 0,7 mg, K 60,9 mg, Cl 14,4 mg in 100 ccm $\text{pH}=6,08$) verordnet, da sich künstlicher Speichel viel geeigneter als Aqua destillata erwies.

Die folgenden Messungen wurden mit diesem Speichel ausgeführt.

1. *Sekretmenge.* Im Interval von 30 Minuten nach oben erwähnter Methode angesammelte Mengen.

2. *Ph.* Kolorimetrisch mit Indikator B. T. B. bestimmt.

3. *Viskosität.* Ausgeführt mit Ostwaldschem Viskosimeter. Bei geringer Sekretmenge wurde ein kleines Visco-stalagmometer gebraucht.

4. *Kalzium.* H. Becks modifizierte Kramer-Tisdall Methode.

5. *Phosphat.* Fiske-Sabbarow Methode.

6. *Stickstoff.* Mikrokjehldahl Methode.

Die Resultate der Bestimmungen sind in Tabelle I angegeben.

(Vergleichung d. Speichels der zahnsteinreichen u.
zahnsteinlosen Personen)

TABELLE I.

Zahnsteinpositiv.						
Prot.-Nr.	Name	Sekret- menge	pH	Viskosität	Kalzium mg%	Phosphat mg%
1	E. U	9,0	6,81	1,465	7,41	7,96
10	T. K	15,0	6,47	1,478	5,12	6,24
18	T. K	9,0	7,08	1,174	5,75	9,91
19	N. U	12,0	6,98	1,783	5,61	10,83
23	S. N	21,0	7,17	2,721	6,12	6,49
30	M. K	15,0	6,98	1,213	8,24	8,45
34	T. I	10,0	6,73	1,143	7,96	9,73
37	K. U	3,0	6,90	1,135	10,61	7,89
38	H. Y	7,0	7,08	1,137	8,68	11,26
39	Y. S	6,0	7,17	1,247	7,34	9,12
40	K. M	5,0	6,64	1,232	13,90	9,55
41	T. K	2,5	6,98	1,191	8,68	7,96
42	K. T	14,0	6,81	1,369	9,78	7,47
43	H. F	5,0	7,08	1,187	9,01	9,85
44	R. S	2,0	6,81	1,090	13,45	12,36
45	T. K	2,5	7,17	1,535	11,89	6,98
47	N. K	5,0	6,78	1,418	7,67	9,06
49	K. T	2,5	6,64	1,189	12,83	11,75

51	K. K	18,0	7,08	1,276	6,42	10,10
52	K. K	5,0	6,73	1,189	6,46	12,61
54	M. K	16,0	7,29	1,221	5,72	9,98
55	M. Y	16,0	7,17	1,160	5,10	9,67
56	E. Y	9,0	6,98	1,324	5,33	10,89
61	S. Y	7,0	6,98	1,428	5,06	13,89
63	G. M	9,0	7,08	1,215	5,24	11,44
64	T. M	8,0	6,64	1,186	7,00	13,22
65	M. Y	11,1	7,08	1,169	4,70	10,47
66	E. N	15,0	6,81	1,100	6,75	11,69
67	M. S	10,0	6,64	1,304	6,60	10,22
70	U. H	5,0	6,4	1,348	7,60	15,54
Durchschnittzahl		9,2	6,91	1,273	7,72	10,09
(Schwankungsgrenze)		2,0-21,0	6,64-7,29	1,090-1,783	5,06-13,90	6,24-15,54

Zahnsteinnegativ.

4	K. K	14,0	6,98	1,476	5,01	6,73
6	K. H	11,0	6,81	2,239	5,85	9,30
9	N. N	9,0	6,81	2,809	7,71	7,71
12	S. K	9,0	6,98	1,388	5,98	8,02
14	T. K	20,0	6,98	1,234	5,66	7,22
15	S. S	9,0	6,81	1,244	4,70	8,69
31	F. H	14,0	6,98	1,511	6,16	7,77
32	T. S	10,0	6,64	1,457	6,65	8,75
35	M. S	9,0	7,17	1,323	6,40	6,73
36	T. M	28,0	7,65	1,375	6,96	8,02
46	Y. K	6,5	6,90	1,795	7,02	9,61
48	H. K	8,0	7,08	1,374	4,94	10,24
50	K. T	2,5	7,08	1,418	10,14	6,36
53	Y. K	10,0	6,81	1,381	6,32	13,83
57	T. U	4,0	6,47	1,395	6,14	16,28
58	T. K	11,0	6,81	1,417	5,47	11,32
59	S. K	4,0	7,17	1,538	5,74	12,36
60	K. K	10,0	6,98	1,328	7,90	10,59
61	T. K	4,0	6,98	1,411	8,04	17,01
68	H. H	12,0	6,64	1,198	5,60	12,36
69	T. H	4,0	6,47	2,299	7,26	16,77
Durchschnittzahl		10,0	6,91	1,553	6,46	10,27
(Schwankungsgrenze)		2,5-28,0	6,47-7,65	1,198-2,299	4,70-10,14	6,36-17,01

Vergleicht man die Werte dieser Tabelle, so lassen sich gleich folgende, interessante Punkte bemerken; 1. Da ist kaum ein Unterschied zwischen den Zahnsteinpositiven und den Negativen in Bezug auf P₁₁ und Phosphat-Gehalt vorhanden; 2. Kalziummenge wird bei Zahnsteinkranken vermehrt gefunden; 3. Die Viskosität ist bei Zahnsteinkranken vermindert. Diese Vermehrung des Kalziumgehalts ist jedoch grösstenteils mit einer Verminderung der Sekretionsmenge verbunden und auch bei normalen Personen beobachtet, während die Viskosität auch in vermindelter Sekretionsmenge immer bei Zahnsteinpositiven verringert gefunden wird. Dieser merkwürdige Unterschied in der Viskosität zwischen zahnsteinkranken und normalen Personen veranlasst mich den N-Gehalt des Speichels der beiden Gruppen zu bestimmen.

Zahnsteinpositive Kranke	38,10 mg%
Zahnsteinnegative Kranke	54,60 mg%

also steht der Stickstoffgehalt bei Zahnsteinpositiven um ein drittel niedriger als der bei Zahnsteinnegativen. Hier bleibt also die Frage offen, ob die grössere Konzentration des Kalzium-phosphates des Speichels auf dessen Niederschlagen als Hauptfaktor einwirken könnte, oder geringerer Gehalt an Stickstoffsubstanzen den Process des Kalziumniederschlagens zu hemmen weniger ausreichend sein würde.

Daher wurde zunächst die Beziehung zwischen der Zahnsteinbildung und dem Kalziumgehalt der an Stickstoffgehalt gleichen Speichel einerseits und der Stickstoffmengen der an Kalziumgehalt gleichen Speichel anderseits untersucht:

Aus Tabelle II u. III kann man ersehen, dass, soweit es sich um Speichel mit gleichem Kalziumgehalt handelt, der Stickstoff-

TABELLE II.

N-Gehalt des Speichels bei gleichem Ca-Gehalt		
Gehalt an Ca (mg%)	Zahnsteinpositiv	Zahnsteinnegativ
5—6	33,31 (mg%)	53,83
6—7	44,73	56,82
7—9	39,46	66,65

TABELLE III.

Ca-Gehalt des Speichels bei gleichem N-Gehalt		
Gehalt an N (mg%)	Zahnsteinpositiv	Zahnsteinnegativ
20—40	6,73 (mg%)	—
40—60	6,91	6,90
60—100	—	7,19

gehalt bei den Zahnsteinpositiven einen viel kleineren Wert zeigt als bei Zahnsteinnegativen, während bezüglich der Speichel mit gleichem Stickstoffgehalt kaum ein Unterschied an Kalziumgehalt zwischen Personen beider Gruppen zu beobachten ist.

II. DER ULTRAFILTRIERTBARE UND NICHTULTRAFILTRIERTBARE ANTEIL DES CALCIUMS IM SPEICHEL.

Der Zustand des Speichels wurde dann untersucht, indem ich den Speichel mittels Ultrafiltrationsapparat abfiltrierte und den Kalziumgehalt des Originalspeichels mit dem des Filtrates verglich.

Der Ultrafiltrationsapparat nach Elford wurde dabei gebraucht.

Die Filtermembran war folgendermassen hergestellt.

1. Schneiden des Zelloidins (Kahlbaum) in kleine Stückchen.
2. Trocknen im Brutschrank bei 37°C zu konstantem Gewicht.
3. Herstellen 10%iger Zelloidinlösung mit absolutem Alkohol : Äther : Aceton = 1 : 1 : 2.
4. Herstellung der folgenden Lösung zur Stärkung und Verdichtung der Membran: 10% Zelloidinlösung 40 g, Amylalkohol 10 g, Alkohol-Äther (1:9) 50 g, Eisessigsäure 1,0 ccm.
5. 50 ccm dieser Lösung wird über die vollständig wagerecht gelegten, flachen Glasszellen von 20 cm Diameter gegossen, dann 1,30—2,0 St. bei 22,5°C—24,0°C abdampft.
6. Abwaschen der überschüssigen Lösungsmittel mit desinfizierter Aqua destillata.
7. Abschneiden der Blattmembran zu Rundstückchen von

3,5 cm Diameter.

8. 3 tages Waschen dieser Stückchen mit durch die Chamberland-Filter von Keimen befreitem Wasser.

9. Aufbewahrung dieser Stückchen im aseptischer Aqua destillata.

Die Beschaffenheit der so hergestellten Filtermembran war folgende.

Sie stellt ein etwas getrübbtes, durchsichtiges Häutchen von 0,18 mm. Dicke dar, welches 0,2 ccm Aqua dest. bei 20°C und unter 760–770 mm. Wasserdruck durchschnittlich in ca. 70 Minuten durchlässt. Das durch diese Membran gewonnen Speichelfiltrat ist vollständig frei von Eiweiss.

5 ccm Speichel wurde im Ultrafiltrationsapparat unter Stickstoff mit 3–4 Atmosphären Luftdruck filtriert. Zur vollständigen Filtration von 5 ccm Speichel wurden ca. 8–9 Stdn. durch den grösseren Apparat von 3 cm Diameter und 20 Stdn. durch den kleineren von 2 cm Diameter erfordert.

Der ultrafiltrierbare Anteil des Kalzium in Speichel.

Das direkt nach Speichelsammlung bei 0°C hergestellte Filtrat enthält sein ultrafiltrierbares Kalzium mit 90% gegen den ursprünglichen Wert wie folgende Tabelle zeigt.

TABELLE I.

Sekretmenge pro Stunde	25 ccm	22 ccm	24 ccm
PH	6,98	6,90	6,90
Ca { Speichel Filtrat	9,04 mg	10,30	9,12
	8,14	9,30	8,30
<u>Ca-Speichel</u> <u>Ca-Filtrat</u>	90%	90%	90%

Natürlicherweise muss diese Filtration direkt nach der Sammlung des Speichels erfolgen, da mit dem Entweichen des Kohlendioxyds sowohl die Löslichkeit des Kalziumphosphates als auch der Zustand des Eiweiss sich verändern.

Ein Versuch, bei dem der Speichel in verschiedenen zeitlichen

Abständen nach der Sammlung und bei Zimmertemperatur filtriert wurde, bewies, dass die Ca-Menge in den Filtraten keinen einheitlichen Prozentsatz gegen den Ursprungswert hatten.

TABELLE II.

Sekretmenge		20 ccm	16 ccm	25 ccm	28 ccm
PH		6,98	6,98	6,90	7,08
Ca mg%	Speichel	10,00	6,04	6,52	7,80
	Filtrat	6,30 63%	4,80 79%	3,74 57%	4,88 63%

Vergleicht man den Kalziumgehalt des Originalspeichels mit dem des Filtrates des im Vakuum kohlendioxidfri gemachten Speichels, so sieht man bei der Direkt-Methode immer 90% Kalziummenge im Filtrat, während bei Speichel, dem CO₂ entzogen wurde stets eine Schwankung der Werte zu beobachten war.

TABELLE III.

Menge		22 ccm	22 ccm	17 ccm	21 ccm
PH	Direkt	6,64	6,81	6,90	6,81
	CO ₂ -entzogen	7,50	7,30	7,90	7,80
Ca mg%	Speichel	8,12	8,60	9,22	7,80
	Direkt	7,08	7,76	8,34	7,04
	Filtrat	87%	90%	90%	90%
	CO ₂ -entzogen	5,40	6,81	5,74	5,70
	Filtrat	67%	79%	62%	73%

Dass der Stickstoff als das für die Ultrafiltration Druck gebende Gas kein Kohlendioxyd enthält oder einen der Kohlendioxydtension des Speichels entsprechenden Gehalt (8%) hat, zeigt Tabelle IV.

In beiden Fälle bemerkt man in der direkt nach der Sammlung ausgeführten Filtration immer denselben Anteil des Kalziums mit Eiweiss gebunden und zwar sind in meinem Speichels etwa 10% des gesammten Calciums mit dem Eiweisses gebunden.

Dagegen ist der Kalziumgehalt im Ultrafiltrat des im Vakuum

TABELLE IV.

Nr.	PH		Ca mg%				
	Direkt	CO ₂ -entzogen	Speichel	Direkt-Filtrat %		CO ₂ -entzogen Filtrat %	
1	6,90	7,80	8,16	7,28	89%	6,19	76%
2	6,90	7,80	7,88	7,08	90	6,27	80
3	6,81	7,90	6,92	6,24	90	5,32	77
4	6,81	7,80	5,20	4,76	91	4,10	79
5	6,81	7,80	6,24	5,68	91	4,60	74
6	6,73	7,90	7,10	6,20	88	5,51	78
7	6,81	7,90	6,04	5,36	89	4,22	70
8	6,81	7,80	7,08	6,40	90	5,36	76
9	6,73	7,76	7,20	6,46	92	5,66	79
Durchmesser	6,81	7,83	6,87	6,18	90%	5,24	76%

von Kohlensäure befreiten Speichels viel geringer. Diese Verminderung ist wohl grösstenteils auf die Ausfällung des Kalziumphosphates zurückzuführen.

Um die Veränderung des Eiweisszustandes beim Entweichen des Kohlendioxydes zu verfolgen, verglich ich die Werte des Reststickstoffs originalen Speichels mit der des Ultrafiltrates sowohl im originalen und von Kohlendioxyd befreitern Speichel.

Wie man aus Tabelle V ersieht, wies der prozentuale Anteil

TABELLE V.

PH		6,98	6,90	6,90
N mg%	Gesamt-N	50,26	53,24	46,34
	Rest-N	32,62 65%	28,42 52%	32,34 70%
	Filtrat-N	21,14 42%	24,08 45%	19,32 42%

des ultrafiltrierten Stickstoffs in direkt auf die Sammlung bei 0°C hergestellten Ultrafiltrats, abstammend von derselben Person, fast keine Schwankung auf.

Mit dem von Kohlensäure bereiten Speichel steigt der Prozentsatz dieses ultrafiltrierten Stickstoffs an, wie Tabelle VI zeigt.

TABELLE VI.

PH	Direkt CO ₂ -entzogen	6,64	6,81	6,90	6,81
		7,50	7,30	7,90	7,80
N mg%	Gesamt-N	45,08	47,04	67,76	50,40
	Rest-N	23,80	36,96	50,40	35,28
		53%	85%	74%	70%
	Direkt	19,04	17,20	26,88	19,32
	Filtrat-N	40%	37%	40%	38%
	CO ₂ -entzogen	19,04	31,12	35,91	25,27
	Filtrat-N	42%	66%	53%	50%

Die Überlegung, worauf diese Vermehrung der filtrierten N-Menge zurückzuführen sei, führte den Verfasser zunächst auf den Gedanken:

1) ein Teil des Eiweisses selbst mag durch Autolyse filtrierbar gemacht werden, oder

2) ein an das Eiweiss gebundener Teil vom Rest-N wird mit der Verschiebung von PH teilweise frei und vermehrt den filtrierten Stickstoffanteil.

Auf letzteren Gedanken stützend verglich ich zunächst den Gehalt von Harnstoff-N in den verschiedenen Filtraten nach der

TABELLE VII.

Nr.	PH		Harnstoff-N mg%		
	Direkt	CO ₂ -entzogen	Direkt-Filtrat	CO ₂ -entzogenes Filtrat	Differenz
1	6,90	7,80	14,56	15,43	0,87
2	6,90	7,80	11,20	14,32	3,32
3	6,81	7,90	8,68	11,97	3,29
4	6,81	7,80	8,64	9,80	1,16
5	6,81	7,80	5,04	6,92	1,88
6	6,73	7,90	9,80	11,97	2,17
7	6,81	7,90	13,72	14,10	0,38
8	6,81	7,80	14,28	16,23	1,95
9	6,73	7,76	10,92	11,44	0,52
Durchmesser	6,81	7,83	10,67	12,53	1,86

TABELLE VIII.

PH	Direkt	6,81	6,73	6,81	6,81	6,73
	CO ₂ -entzogen	7,80	7,90	7,90	7,80	7,76
N mg%	Gesamt-N	38,08	36,40	61,04	47,04	51,52
	Direkt-Rest-N	18,48	13,44	26,32	20,16	21,28
	CO ₂ -entzogen-R-N	18,47	14,36	27,66	21,81	22,34
	Differenz	-0,01	0,92	1,34	1,65	1,06
	Direkt-Filtrat-N	7,84	11,76	14,00	15,12	17,92
	CO ₂ -ent.-Filtrat-N	12,24	12,23	17,02	18,08	18,62
	Differenz	4,40	0,47	3,02	2,97	0,70
	Direkt-Filtrat Harnstoff-N	5,04	9,80	13,72	14,28	10,92
	CO ₂ -ent.-Filtrat Harnstoff-N	6,92	11,97	14,10	16,23	11,44
	Differenz	1,88	2,17	0,38	1,95	0,52

Methode von Van-Slyke u. Cullen, und fand dass die Harnstoff-N-Menge in den von CO₂ befreiten Filtraten immer einige Vermehrung zeigte, gegenüber den direkt nach der Sammlung erhaltenen Filtraten. (Tabelle IX)

TABELLE IX.

	CO ₂ -entzogen bei Zimmertemperatur	CO ₂ -entzogen bei 0°C
PH Direkt	6,81	6,81
CO ₂ -entzogen	7,76	7,80
Gesamt-N (mg%)	38,64	67,20
Direkt-Rest-N	16,24	45,36
CO ₂ -ent.-Rest-N	17,02	49,28
Differenz	0,78	3,92
Direkt-Harnstoff-N	14,00	16,52
CO ₂ -ent.-Harnstoff-N	15,96	19,32
Differenz	1,96	2,80
Direkt-Filtrat-N	16,24	33,04
CO ₂ -ent.-Filtrat-N	16,49	36,40
Differenz	0,25	3,36
Direkt-Filtrat- Harnstoff-N	14,00	13,16
CO ₂ -ent.-Filtrat- Harnstoff-N	14,90	15,40
Differenz	0,90	2,24

Diese Vermehrung an Rest-N-Menge nach CO₂-Beseitigung wird natürlich schon im Speichel vor der Ultrafiltration beobachtet wie Tabelle X zeigt.

Da auch möglicher Weise bei dem das CO₂-beseitigenden Verfahren allein schon eine Autolyse vorkommen und dadurch die Vermehrung von Rest-N hervorrufen kann, so wurden sowohl die Sammlung als auch das CO₂-beseitigende Verfahren bei 0°C vorgenommen. Die Menge von Rest-N und Harnstoff vor der Filtration und im Ultrafiltrat wurden verglichen.

Aus diesen Ergebnissen konnte man wohl schliessen, dass der Speichel während des CO₂-Beseitigungsverfahrens an Alkalität zunimmt und ein Teil von vorher mit Eiweiss gebundenen Reststickstoff, hauptsächlich aus Harnstoff bestehend, losgelöst wird.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei zahnsteinpositiven Personen ist Eiweissgehalt und Viskosität des Speichels viel geringer als bei Zahnsteinnegativen. Dieses Ergebniss zeigt, dass Eiweiss als Schutzkolloid auf die Ausfällung des Calciumphosphats hemmend wirkt.

2. Der Ultrafiltrierbare Anteil des Speichelecalciums ist ziemlich konstant bei derselben Person. In meinem Speichel beträgt der ultrafiltrierbare Anteil ungefähr 90% des gesammten Calciums.

3. Nach Kohlensäureaustreibung vermehrt sich der ultrafiltrierbare Stickstoff um einen gewissen Betrag, welcher grösstenteils als aus dem mit Eiweiss gebundenem Anteil des Harnstoff abstammend zu betrachten ist.

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Prof. Dr. S. Kakiuchi für seine freundlichen Ratschläge bei dieser Arbeit meinen besten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Bibby, B. G. (1935): Dental Cosmos 7.
Elford, W. J. (1931): J. pathology and Bact., 34.
Öyama, S. (1927): Kōkukagakai-zasshi, 1.

INDEX TO VOLUME 31.

A

- Acetaldehyde, On the influence of various kinds of nutrition upon the ——— formation in the liver. 215.
- Acetaldehyde, The ——— formation in the liver of dogs damaged with carbon tetrachloride. 215.
- Acetaldehyde, The ——— formation in the liver of dogs in a condition of hunger. 215.
- Acetaldehyde, The ——— formation in the liver dogs nourished by a protein-fat diet. 215.
- Allantoisflüssigkeit, Untersuchung über die chemische Zusammensetzung der Amnios- und ——— des Meer-schildkrötenembryos. 303.
- Amniosflüssigkeit, Untersuchung über die chemische Zusammensetzung der ——— und Allantoisflüssigkeit des Meerschildkrötenembryos. 303.
- Amylopektin, über die Wirkung der Speichelamylase auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von Speichel- und Pankreasamylase auf ——— und Amylose. 429.
- Amylose, Über die Wirkung der Speichelamylase auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von Speichel- und Pankreasamylase auf Amylopektin und ———. 429.
- Anilide, N-glucosides of aniline derivatives, and ———s of various sugars. 95.
- Aniline, N-glucosides of ——— derivatives, and anilides of various sugars. 95.

Anthropo-desoxycholic acid, Colour reactions of ———, their specificity, and their applicability to the quantitative determination of the acid. 43.

B

- Blood, Studies on ——— and urinary amylase. 471.
- Blood serum, The concentration of the hormone in the ——— during pregnancy. 273.
- Blutbestandteil, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf den Lipoidphosphor im Blutplasma und in den geformten ———en. 79.
- Blutgefäss, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Phosphatide im Blut der Vena linealis und der peripheren ———e. 61.
- Blutplasma, Die Wertveränderung des Phosphatids und der Proteinfraktion des ———s im Winter. 243.
- Blutplasma, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf den Lipoidphosphor im ——— und in den geformten Blutbestandteilen. 79.
- Blutplasma, Studien über verschiedene Einflüsse auf Veränderung des Eiweisskörpers und Phosphatids des ———s besonders auf ihre gegenseitige Beziehung. 243.

C

- Carbohydrate, Biochemical studies on ——— s. 343, 351, 357.

Carbon tetrachloride, The acetaldehyde formation in the liver of dogs damaged with ———. 215.

Carboxylase, Über die Reinigung der ———. 137.

Caseino-Trypton, Über das ———. 335.

Chaulmoograöl, Biochemische Studium über das ———. 109.

Chaulmoograöl, Über die Ausscheidung des ———s im Harn des mit Chaulmoograöl injizierten Kaninchens. 109.

Chaulmoograöl, Über die Ausscheidung des Chaulmoograöls im Harn des mit ——— injizierten Kaninchens. 109.

CHEN, Tsi-Tsao, Tameji HIROOKA und Masamiti KAWARADA. Über das Caseino-Trypton. 335.

CHIBA, Hajime, Nao UYEI, Masao ITO und Toyokichi KITASAWA, Studies on the gonad-stimulating hormone of pregnant mare serum, I. The concentration of the hormone in the blood serum during pregnancy. 273.

Cholesterin, Über das Verhalten des ———s im Blute und im Pleuralergusse bei der Cholesterinpleuritis. 453.

Cholesterin, Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskels des mit ——— gefütterten Kaninchens nach der Gefässunterbindung. 155.

Cholesterin-Kost, Über die Mengenschwankung der verschiedenen Substanzen in den Muskels des Kaninchens mit normaler sowie ——— nach der Gefässunterbindung. 163.

Cholesterinpleuritis. Über das Verhalten des Cholesterins im Blute und im Pleuralergusse bei der ———.

453.

Cholsäure, Bildung von Desoxycholsäure aus ——— bei Fäulnis des Pankreas. 467.

Colour reactions of anthro-po-desoxycholic acid, their specificity, and their applicability to the quantitative determination of the acid. 43.

D

α -Dehydrohyodesoxycholsäure, Über das Schicksal des ——— im Kaninchenorganismus. 463.

Desoxycholsäure, Bildung von ——— aus Cholsäure bei Fäulnis des Pankreas. 467.

Diphtherietoxin, Über den Einfluss der Fettdiät auf die Parese als Folge von ———. 443.

Dog, The acetaldehyde formation in the liver of ———s damaged with carbon tetrachloride. 215.

Dog, The acetaldehyde formation in the liver of ———s in a condition of hunger. 215.

Dog, The acetaldehyde formation in the liver of ———s nourished by a protein-fat diet. 215.

E

Eisengehalt, Über die Spaltung der Speichelamylase durch Proteasen und über ihren Kohlenhydrat- und ———. 421.

Eiweisskörper, Studium über verschiedene Einflüsse auf Veränderung des ———s und Phosphatids des Blutplasmas, besonders auf ihre gegenseitige Beziehung. 243.

Ernährungsweise, Über den Einfluss verschiedener ———n auf die Bildung von α -Pyridinursäure. 409.

F

- Fäulnis, Bildung von Desoxycholsäure aus Cholsäure bei — des Pankreas. 467.
- Ferment, Über die — e der Schlangengorgane. 13.
- Fettdiät, Über den Einfluss der — auf die Parese als Folge von Diphtherietoxin. 443.
- Fettleber, Über den nervösen Einfluss auf die Entstehung von — bei der Vergiftung. 181.
- Fettmenge, Über die — in der Leber beim Hunger. 197.
- Fettstoffe, Studium über die — der Säurefestbazillen in der Erde. 247.
- Fettstoffe, Über die — der Schlangeng. 1.
- Fötale Geschlechtsbestimmung. 331.

G

- Gallensäure, Über die — n in der Schlangengalle. 21.
- Gefäßunterbildung, Über die Mengenschwankung der verschiedenen Substanzen in den Muskeln des Kaninchens mit normaler sowie Cholesterin-Kost nach der —. 163.
- Gefäßunterbindung, Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskeln des mit Cholesterin gefütterten Kaninchens nach der —. 155.
- Gefäßunterbindung, Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskeln nach der —. 143.
- Globulinnatur, Über die — der Speichelamylase. 69.
- Glutathion, Über die Bestimmung des — s im Gewebe. 35.
- Gonad-stimulating hormone, Studies

on the — — of pregnant mare serum. 273.

H

- HANAOKA, Kenzi. Studies on N-glucosides. II. N-glucosides of aniline derivatives, and anilides of various sugars. 95.
- Harn, Biochemisches Studium über das Chaulmoograöl. Über die Ausscheidung des Chaulmoograöls im — des mit Chaulmoograöl injizierten Kaninchens. 109.
- Harn, Über die Histidinausscheidung im —. 289.
- Heparin. 343.
- HIROOKA, Tameji, Tsi-Tsao CHEN und Masamiti KAWARADA. Über das Caseino-Trypton. 335.
- Histidinausscheidung. Über die — im Harn. 289.
- Hormone, The concentration of the — in the blood serum during pregnancy. 273.
- Hund, Einfluss der Ultraviolett- und Röntgenbestrahlung der Milz des mit hämolysiertem Blut injizierten — es auf Lipoid-Phosphor, Lipoid-Stickstoff und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259.
- Hund, Über die Mikrobestimmungsmethode von Lipoid-Amino-N im Blut des — es. 55.
- Hunger, Über die Fettmenge in der Leber beim — n. 197.

I

- IMAMURA, Gen-ichiro, Untersuchung über die chemische Zusammensetzung der Amnios- und Allantoisflüssigkeit des Meerschilkrötenembryos. 303.
- IMAMURA, Hiroyuki, Chemie der

Schlangen. II. Über die Fettstoffe der Schlangen. 1.

III. Über die Fermente der Schlangenorgane. 13.

IV. Über die Gallensäuren in der Schlangengalle. 21.

V. Über die anorganischen Bestandteile der Schlangemuskeln. 23.

ITO, Masao, Nao UYEI, Toyokichi KITASAWA and Hajime CHIBA. Studies on the gonad-stimulating hormone of pregnant mare serum. I. The concentration of the hormone in the blood serum during pregnancy. 273.

ИТО, Masao, Nao UYEI, Masayoshi KATO and Toru TAKAHASHI. A comparison of alkaline alcoholic and acid acetone extraction methods of preparing lactogenic hormone of the anterior pituitary. 371.

ИТО, Ryoji. Fötale Geschlechtsbestimmung. 331.

K

KAN, Sekisen, Über die Mikrobestimungsmethode von Lipoid-Amino-N im Blut des Hundes. 55.

KAN, Sekisen. Über den Untersuchung des Phosphatidumsatz. Über die Menge des hämolysierten Blutes, benutzt in der Untersuchung des "Einflusses der Injektion des hämolysierten Blutes auf den Phosphatidumsatz der Milz." 27.

Einflüsse der Injektion des hämolysierten Blutes auf Phosphatide im Blut der Vena lienalis und der peripheren Blutgefäße. 61.

Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf den Lipoid-

phosphor im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen. 79.

Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N in Milz und Leber. 91.

Einfluss der Ultraviolett- und Röntgenbestrahlung der Milz des mit hämolysierten Blut injizierten Hundes auf Lipoid-Phosphor, Lipoid-Stickstoff und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259.

KAMEDA, Hiroo, Studium über die Fettstoffe der Säurefestbazillen in der Erde. 247.

Kaninchen, Biochemisches Studium über das Chaulmoograöl. Über die Ausscheidung des Chaulmoograöls im Harn des mit Chaulmoograöl injizierten —s. 109.

Keninchen, Über die Mengenschwankung der verschiedenen Substanzen in den Muskeln des —s mit normaler sowie Cholesterin-Kost nach der Gefäßunterbindung. 163.

Kaninchen, Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskeln des mit Cholesterin gefütterten —s nach der Gefäßunterbindung. 155.

Kaninchenorganismus, Über das Schicksal der α -Dehydrohyodesoxycholsäure im —. 463.

KATO, Masayoshi, Nao UYEI, Masao ITOH and Toru TAKAHASHI, A comparison of alkaline alcoholic and acid acetone extraction methods of preparing lactogenic hormone of the anterior pituitary. 371.

KAWARADA, Masamiti, Tsi-Tsao CHEN und Tameji HIROOKA, Über das Caseino-Trypton. 335.

Kepalin, Bestimmungsmethode des in — vermengten Kolamins. 415.

- Keratin, Partielle Spaltung des —s. 383.
- Kidney, A new estimation method of urinary amylase, excretion from normal human —. 471.
- KITASAWA, Toyokichi, Nao UYEI, Masao ITO and Hajime CHIBA, Studies on the gonad-stimulating hormone of pregnant mare serum. I. The concentration of the hormone in the blood serum during pregnancy. 273.
- Kohlenhydratgehalt, Über die Spaltung der Speichelamylase durch Proteasen und über ihren — und Eisengehalt. 421.
- Kolamin, Bestimmungsmethode des in Kephalin vermengten —s. 415.
- KONDOH, Yūiti, Hajime MASAMUNE und Masami SUZUKI. Biochemical studies on carbohydrates. LVI. Heparin. 343.
- KOYANAGI, Jokiti, Biochemisches studium über das Chaulmoograöl. Über die Ausscheidung des Chaulmoograöls im Harn des mit Chaulmoograöl injizierten Kaninchens. 109.
- KUSUI, Kenzo und Kazuo MUNEHISA. Über das Verhalten des Cholesterins im Blute und im Pleuralergusse bei der Cholesterinpleuritis. 453.
- KUSUNOKI, Masao. Studien über die Zahnsteinbildung (I). 481.
- P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N in Milz und —. 91.
- Leber, Über die Fettmenge in der — beim Hunger. 197.
- Lipoid-Amino-N, Über die Mikrobestimmungsmethode von — im Blut des Hundes. 55.
- Lipoid-Amino-Stickstoff, Einfluss der Ultraviolett- und Röntgenbestrahlung der Milz des mit hämolysiertem Blut injizierten Hundes auf Lipoid-Phosphor, Lipoid-Stickstoff und — — — im Blut. 259.
- Lipoidmenge, Über die Schwankung der — in den Muskeln nach der Gefässunterbindung. 143.
- Lipoidmenge, Über die Schwankung der — in den Muskeln des mit Cholesterin gefütterten Kaninchens nach der Gefässunterbindung. 155.
- Lipoid-N, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoid-P, — und Lipoid-NH₂-N in Milz und Leber. 91.
- Lipoid-NH₂-N, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoid-P, Lipoid-N und — in Milz und Leber. 91.
- Lipoid-P, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf — Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N in Milz und Leber. 91.
- Lipoidphosphor, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf den — im Blutplasma und in den geformten Blutbestandteilen. 79.
- Lipoid-Phosphor, Einfluss der Ultraviolett- und Röntgenbestrahlung der Milz des mit hämolysiertem Blut —, Lipoid-Stickstoff und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259.
- Lipoid-Stickstoff, Einfluss des Ultra-

L

- Lactogenie hormone, A comparison of alkaline alcoholic and acid acetone extraction methods of preparing — — — of the anterior pituitary. 371.
- Leber, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoid-

violet- und Röntgenbestrahlung der Milz des mit hämolysiertem Blut injizierten Hundes auf Lipoid-Phosphor, — und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259.

Liver, On the influence of various kinds of nutrition upon the acetaldehyde formation in the —. 215.

Liver, The acetaldehyde formation in the — of dogs damaged with carbon tetrachloride. 215.

Liver, The acetaldehyde formation in the — of dogs in a condition of hunger. 215.

Liver, The acetaldehyde formation in the — of dogs nourished by a protein-fat diet. 215.

M

Mare, Studies on the gonad-stimulating hormone of pregnant — serum. 273.

MASAMUNE, Hajime, Masami SUZUKI and Yūiti KONDOH, Biochemical studies on carbohydrates. LVI. Heparin. 343.

Meerschildkrötenembryo, Untersuchung über die chemische Zusammensetzung der Amino- und Allantoisflüssigkeit des —s. 303.

Mikrobestimmungsmethode, über die — von Lipoid-Amino-N im Blut des Hundes. 55.

Milz, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Lipoid-P, Lipoid-N und Lipoid-NH₂-N in — und Leber. 91.

Milz, Einfluss der Ultraviolett- und Röntgenbestrahlung der — des mit hämolysiertem Blut injizierten Hundes auf Lipoid-Phosphor, Lipoid-Stickstoff und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259.

Milz, Über die Menge des hämolysierten Blutes, benutzt in der Untersuchung des "Einflusses der Injektion des hämolysierten Blutes auf den Phosphatidumsatz der —. 27.

MORI, Tanenao. Über das Schicksal der α -Dehydrohydroscholesäure im Kaninchenorganismus. 463.

MORI, Tanenao. Bildung von Desoxycholesäure aus Cholsäure bei Fäulnis des Pankreas. 467.

Mucoid, Sclera — and its prosthetic group. 351.

MUNEHISA, Kazuo und Kenzo KUSUI, Über das Verhalten des Cholesterins im Blute und im Pleuralerguss bei der Cholesterinpleuritis. 453.

Muskel, Über die Schwankung der Lipoidmenge in den —n des mit Cholesterin gefütterten Kaninchens nach der Gefäßunterbindung. 155.

Muskel, Über die Schwankung der Lipoidmenge in den —n nach der Gefäßunterbindung. 143.

Muskel, Über die Mengenschwankung der verschiedenen Substanzen in den —n des Kaninchens mit normaler sowie Cholesterin-Kost nach der Gefäßunterbindung. 163.

N

NAGAOKA, Masanari. Über die Oxydation im Organismus. I. Mitteilung. Oxydation von α -Picolin in den verschiedenen Organen. 363.

II. Mitteilung. Über den Einfluss verschiedener Ernährungsweisen auf die Bildung von α -Pyridinsäure. 409.

NAKAMURA, Koichi, Studies on protease. I. The cleavability of

- various proteins by trypsin and papain. 311.
- N-glycoside, Studies on —s. 95.
- N-glucosides of aniline derivatives, and anilides of various sugars. 95.
- NINOMIYA, Hideo, Beitrag zur Kenntnis der Speichelamylase. I. Mitteilung: Über die Globulinnatur der Speichelamylase. 69.
- II. Mitteilung: Über die Spaltung der Speichelamylase durch Proteasen und über ihren Kohlenhydrat- und Eisengehalt. 421.
- II. Mitteilung: Über die Wirkung der Speichelamylase auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von Speichel- und Pankreasamylase auf Amylopektin und Amylose. 429.
- IV. Mitteilung: Über die Immunisierung mit Speichelamylase. 437.
- Nitrogen, On non-protein — and its constituents. 205.
- Non-protein nitrogen, On — and its constituents. 205.
- NUMATA, Isamu. Über die Bestimmung des Glutathions im Gewebe. 35.

O

- OHTA, Seiichi, Über den nervösen Einfluss auf die Entstehung von Fettleber bei der Vergiftung. 181.
- OHTA, Seiichi, Über die Fettmenge in der Leber beim Hunger. 197.
- Organ, Oxydation von α -Picolin in den verschiedenen —en. 363.
- Organismus, Über die Oxydation im —. 409.
- OTSUJI, Kazuo, Untersuchungen über den partiellen Abbau der Proteine. IV. Mitteilung. Partielle Spaltung des Keratins. 383.
- Oxydation, Über die — im Organismus. 363, 409.
- Oxydation von α -Picolin in den verschiedenen Organen. 363.

P

- Pankreas, Bildung von Desoxycholsäure aus Cholsäure bei Faulnis des —. 467.
- Pankreasamylase, Über die Wirkung der Speichelamylase auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von Speichel- und — auf Amylopektin und Amylose. 429.
- Papain, The cleavability of various proteins by trypsin and —. 311.
- Parese, Über den Einfluss der Fettdiät auf die — als Folge von Diphtherietoxin. 443.
- Pepsin, The cleavability of various proteins by —. 323.
- Phosphatid, Die Wertveränderung des — s und der Protein-Fraktion des Blutplasmas im Winter. 243.
- Phosphatid, Einflüsse der Injektion des hämolysierten Blutes auf —e im Blut der Vena lienalis und der peripheren Blutgefäße. 61.
- Phosphatid, Studien über verschiedene Einflüsse auf Veränderung des Eiweisskörpers und —s des Blutplasmas, besonders auf ihre gegenseitige Beziehung. 243.
- Phosphatidumsatz, Über die Menge des hämolysierten Blutes, benutzt in der Untersuchung des Einflusses der Injektion des hämolysierten Blutes auf den — der Milz. 27.
- Phosphatidumsatz, Untersuchung über den —. 27, 67, 79, 91, 259.

- α -Picolin, Oxydation von — in den verschiedenen Organen. 363.
- Pleuralerguss, Über das Verhalten des Cholesterins im Blute im — bei der Cholesterinpleuritis. 453.
- Protease, Studies on —. 311, 323.
- Protease, Über die Spaltung der Speichelamylase durch —n und über ihren Kohlenhydrat- und Eisengehalt. 421.
- Protein, The cleavability of various —s by pepsin. 323.
- Protein, The cleavability of various —s by trypsin and papain. 311.
- Protein-fat-diet, The acetaldehyde formation in the liver of dogs nourished by a ——. 215.
- Protein-Fraktion, Die Wertveränderung des Phosphatids und der — - — des Blutplasmas im Winter. 243.
- α -Pyridinursäure, Über den Einfluss verschiedener Ernährungsweisen auf die Bildung von —. 409.

R

- Ri, Kokusho, On the influence of various kinds of nutrition upon the acetaldehyde formation in the liver. Report II.
- I. The acetaldehyde formation in the liver of dogs in a condition of hunger.
- II. The acetaldehyde formation in the liver of dogs nourished by a protein-fat diet.
- III. The acetaldehyde formation in the liver of dogs damaged with carbon tetrachloride. 215.
- Rin, Keiso, Studies on the changes in the physiological conditions of the new-born infant. Report IX. On non-protein nitrogen and its constituents. 205.
- Röntgenbestrahlung, Einfluss der Ultraviolett- und — der Milz des mit hämolysiertem Blut injizierten Hundes auf Lipoid-Phosphor, Lipoid-Stickstoff und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259

S

- SABA, George, Colour reactions of anthrope-desoxycholic acid, their applicability to the quantitative determination of the acid. 43.
- SAITO, Shimeo, Biochemische Untersuchungen über die unverseifbaren Substanzen.
- II. Mitteilung: Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskeln nach der Gefässunterbindung. 143.
- III. Mitteilung: Über die Schwankung der Lipoidmenge in den Muskeln des mit Cholesterin gefütterten Kaninchens nach Gefässunterbindung. 155.
- IV. Mitteilung: Über die Mengenschwankung der verschiedenen Substanzen in den Muskeln des Kaninchens mit normaler sowie Cholesterin-Kost nach der Gefässunterbindung. 163.
- SAKAGUCHI, Tenpei. Über die Histidinausscheidung im Harn. 289.
- SATO, Tamazi, Biochemical studies on carbohydrates. LVII. Sclera mucoid and its prosthetic group. First Paper. 351.
- Säurefestbazillen, Studium über die Fettstoffe der — in der Erde. 247.
- Schlange, Chemie der —n. 1, 13, 21, 23.
- Schlange, Über die Fettstoffe der —n. 1.
- Schlangengalle, Über die Gallensäuren

- in der ——. 21.
- Schlangenmuskel, Über die anorganischen Bestandteile der ——. 23.
- Schlangenorgan, Über die Fermente der ——. 13.
- Sclera mucoid and its prosthetic group. First Paper. 351.
- Serum, Studies on the gonad-stimulating hormone of pregnant mare ——. 273.
- Speichel, Über die Wirkung der Speichelamylase auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von — und Pankreasamylase auf Amylopektin und Amylose. 429.
- Speichelamylase, Beitrag zur Kenntnis der ——. 69, 421, 429, 437.
- Speichelamylase, Über die Globulinatur der ——. 69.
- Speichelamylase, Über die Immunisierung mit ——. 437.
- Speichelamylase, Über die Spaltung der — durch Proteasen und über ihren Kohlenhydrat- und Eisengehalt. 421.
- Speichelamylase, Über die Wirkung der — auf die verschiedenen Stärkearten und über den Wirkungsunterschied von Speichel- und Pankreasamylase auf Amylopektin und Amylose. 429.
- Sugar, N-glucosides of aniline Derivatives, and anilides of various ——. 95.
- SUGAYA, Kichinosuke, Studien zur Zymaseanalyse. 119.
- SUGAYA, Kichinosuke, Über die Reinigung der Carboxylase. 137.
- SUZUKI, Masami, Biochemical studies on carbohydrates. LVIII. Prosthetic group of tendomucoid. First Paper. 357.
- SUZUKI, Masami, Hajime MASAMUNE and Yūiti KONDOH, Biochemical

studies on carbohydrates. LVI. Heparin. 343.

T

- TAKAHASHI, Tohru, Nao UYEI, Masao ITOH and Masayoshi KATO, A comparison of alkaline alcoholic and acid acetone extraction methods of preparing lactogenic hormone of the anterior pituitary. 371.
- TAMAI, Masamitsu, Studies on blood and urinary amylase. I. A new estimation method of urinary amylase, excretion from normal human kidney. 411.
- TAMURA, Shunkiti, Über den Einfluss der Fettdiät auf die Parese als Folge von Diphtherietoxin. 443.
- Tendomucoid, Prosthetic group of ——. 357.
- Trypsin, The cleavability of various proteins by — and papain. 311.

U

- UCHINO, Takashi, Studies on protease. II. The cleavability of various proteins by pepsin. 323.
- Ultraviolettbestrahlung, Einfluss der — und Röntgenbestrahlung der Milz des hämolysierten Blut injizierten Hundes auf Lipoid-Phosphor, Lipoid-Stickstoff und Lipoid-Amino-Stickstoff im Blut. 259.
- Urinary amylase, A new estimation method of — —, and excretion from normal human kidney. 471.
- Urinary amylase, Studies on blood and — —. 471.
- UYEI, Nao, Masao ITOH, Masayoshi

KATO and Tohru TAKAHASHI, A comparison of alkaline alcoholic and acid acetone extraction methods of preparing lactogenic hormone of the anterior pituitary. 371.

UYEI, Nao, Masao ITO, Toyokichi KITAZAWA and Hajime CHIBA, Studies on the gonad-stimulating hormone of pregnant mare serum. I. The concentration of the hormone in the blood serum during pregnancy. 273.

V

Vena lienalis, Einfluss der Injektion des hämolysierten Blutes auf Phosphatide im Blut der ——— und der peripheren Blutgefäße. 61.

Vergiftung, Über den nervösen Ein-

fluss auf die Entstehung von Fettleber bei der ———. 181.

Y

YOSIDA, Norio, Studium über verschiedene Einfluss auf Veränderung des Eiweisskörpers und Phosphatids des Blutplasmas, besonders auf ihre gegenseitige Beziehung. Die Wertveränderung des Phosphatids und der Proteinfraction des Blutplasmas in Winter. 243.

YOSINAGA, Tosio. Bestimmungsmethode des in Kephalin vermengten Kolamins. 415.

Z

Zahnsteinbildung, Studien über die ———. 481.

Zymaseanalyse, Studien zur ———. 119.

